

Aus dem Institut für Virologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie - Institut für Virologie  
Leiter: Prof. Dr. Stephan Becker  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

# **Etablierung allgemein anwendbarer Influenza A- Virusnachweise auf Basis immunkompetenter Peptid-Epitope im Vergleich zu RT-PCR aus Saliva**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Carsten Ferdinand Schöneberg**

aus Bendorf/Rhein

Marburg/Lahn, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 15.04.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. W. Garten
Koreferent:	PD Dr. Dr. H.G. Wahl

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Klassifizierung und Nomenklatur.....	1
1.1.1 Influenza A- und Influenza B- Viren.....	1
1.2 Struktur und Charakterisierung.....	2
1.3 Funktionen der viralen Proteine.....	3
1.3.1 Nukleoproteine.....	3
1.3.1.1 Nukleoprotein (NP).....	3
1.3.1.2 Polymerasekomplex (P).....	4
1.3.2 Hüllproteine.....	4
1.3.2.1 Hämagglutinin (HA).....	4
1.3.2.2 Neuraminidase (NA).....	4
1.3.3 Nicht-glykosylierte Proteine.....	5
1.3.3.1 Matrixproteine (M).....	5
1.3.4 Nichtstruktur-Proteine.....	6
1.4 Vermehrungszyklus von Influenza A- Viren.....	6
1.5 Antigen shift und Antigendrift.....	8
1.6 Pathogenese und Klinik der Influenza-Erkrankung .....	9
1.6.1 Pathophysiologie der Influenza.....	9
1.6.1.1 Gerinnungssystem.....	9
1.6.2 Klassische Influenza.....	10
1.6.2.1 Sudden onset.....	10
1.6.2.2 Symptomatik.....	10
1.6.2.3 Klinische Befunde.....	11
1.6.3 Influenza bei Schwangeren.....	12
1.6.4 Influenza bei Kindern.....	12
1.6.4.1 Symptomatik.....	12
1.6.5 Influenza bei alten Menschen.....	13
1.6.5.1 Symptomatik.....	13
1.6.6 Rekonvaleszenz.....	14
1.6.7 Komplikationen der Influenzaerkrankung.....	14
1.6.7.1 Herzerkrankungen.....	14
1.6.7.1.1 Symptomatik und klinische Befunde.....	14
1.6.7.1.2 Diagnostik.....	15
1.6.7.2 Pneumonie.....	16

1.6.7.2.1 Klinik.....	16
1.6.7.2.2 Diagnostik.....	17
1.6.7.3 Komplikationen der oberen Atemwege.....	17
1.6.7.4 Reye-Syndrom.....	18
1.6.7.5 COPD-Exazerbation.....	18
1.6.7.6 Pneumokokkenmeningitis.....	18
1.6.7.7 Bauchgrippe.....	18
1.6.8 Übersterblichkeit.....	18
1.7 Immunantwort gegen Influenza A- Viren.....	19
1.8 Diagnose von Influenza.....	20
1.9 Therapie einer Influenza- Infektion.....	22
1.9.1 Amantadin.....	22
1.9.2 Neuraminidase- Inhibitoren.....	22
1.9.2.1 Zanamivir.....	23
1.9.2.2 Oseltamivir.....	23
1.9.3 Empfehlung zur Therapie der Influenza.....	23
1.10 Prophylaxe einer Influenza- Infektion.....	24
1.10.1 Impfung.....	24
1.10.1.1 Empfehlungen der Ständigen Impfkommision am RKI .....	25
1.10.2 Medikamentöse Prophylaxe.....	25
1.11.1 Historische Pandemien.....	26
1.11.2 Influenza- Aktivität in Deutschland in der Saison 08/09.....	27
1.12 Pandemie H1N1/2009, die sogenannte Schweinegrippe.....	32
2 Problemstellung.....	36
3 Material.....	37
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	37
3.2 Enzyme.....	40
3.3 Antikörper.....	41
3.3.1 Monoklonale Antikörper.....	41
3.4 Vektoren und Matrizen.....	41
3.4.1 Vektor pGEX-6P-1.....	41
3.4.2 Vektor pQE 30.....	42
3.5 Bakterienstämme.....	44
3.6 Kits.....	44
3.7 Nährmedien und Puffer für Bakterien- und Zellkultur.....	45

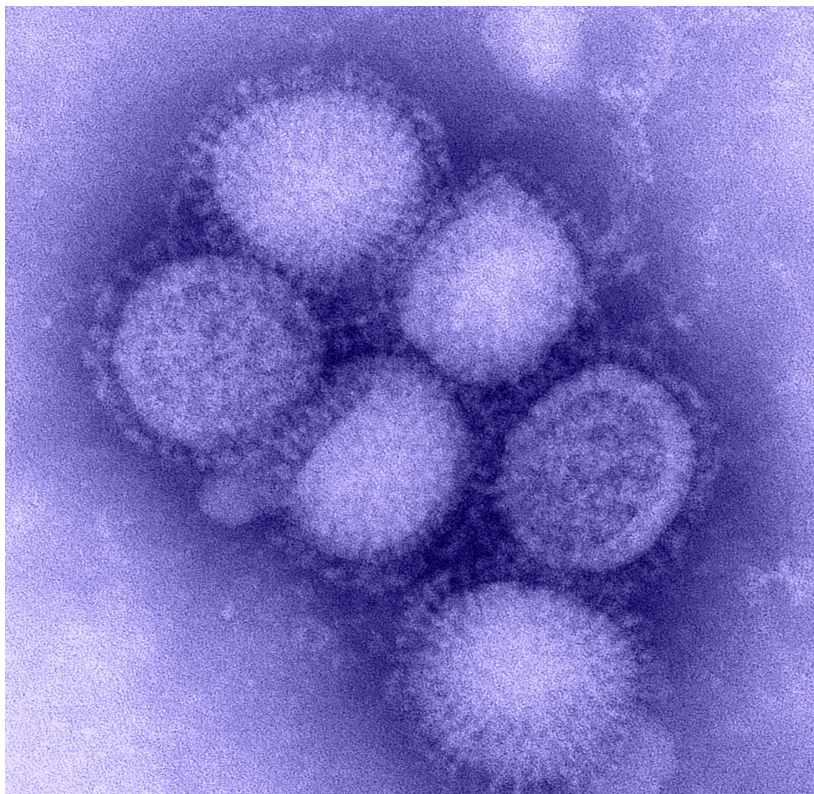
3.8 Puffer für Elektrophorese und Elektroblothing.....	46
3.9 Puffer für Proteinexpression, Reinigung und Enzymaktivitätstest.....	48
3.10 Geräte und Systeme.....	49
3.11 Chromatographiesäulen.....	49
3.12 Oligonukleotide.....	49
4 Methoden.....	51
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	51
4.1.1 Amplifikation der gewünschten DNA-Segmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
4.1.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
4.1.2 Reinigung der PCR-Amplifikate.....	53
4.2 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	53
4.2.1 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA.....	54
4.2.2 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA.....	54
4.2.3 Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen.....	56
4.3 Restriktion von DNA .....	56
4.3.1 Phenolextraktion und Ethanolfällung von DNA.....	57
4.4 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese.....	57
4.4.1 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	59
4.5 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide.....	60
4.6 Transformation von E. coli.....	60
4.6.1 Herstellung kompetenter E. coli Zellen.....	60
4.6.2 Transformation.....	61
4.7 Sequenzierung.....	62
4.7.1 Sequenzierreaktion.....	62
4.7.2 Sequenziergel und Elektrophorese.....	63
4.8 Expression rekombinanter Proteine.....	64
4.8.1 Expression rekombinanter Proteine mittels des pGex-6P-1-Systems und deren Aufreinigung.....	65
4.8.2 Expression rekombinanter Proteine mittels des pQE-Systems und deren Aufreinigung.....	66
4.9 Proteinchemische und immunologische Methoden.....	69
4.9.1 Bio-Rad Protein-Bestimmung.....	69
4.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	70
4.9.2.1 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	71

4.9.3 Immunoblot-Verfahren.....	72
4.9.3.1 Halbtrockenblot-Verfahren .....	72
4.9.3.2 Nass-Blot-Verfahren.....	73
4.9.3.3 Immunofärbung der Immunoblots.....	74
4.10 Präparative Proteinreinigung mittels FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography).....	75
4.11 Methodik der Studie zum Nachweis von Influenza aus Saliva.....	76
4.11.1 Studienteilnehmer.....	76
4.11.2 RNA Extraktion und PCR.....	76
4.11.3 Vorversuche.....	77
4.11.4 FLU A/B Rapid Assay (Roche).....	77
4.11.5 Konzentration von Influenzaviren aus Saliva.....	78
4.11.6 Vorversuch für Anreicherung von Influenzaviren aus Saliva.....	78
5 Ergebnisse.....	79
5.1 Identifizierung neuer Influenza – Proteine .....	79
5.2 Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von N1'.....	79
5.2.1 Amplifikation von N1'.....	79
5.2.2 Subklonierung von N1' in den Expressionsvektor pGex-6P-1.....	80
5.2.3 Transformation in E.coli und Überprüfung des pGex-6P-1 Konstrukts .....	81
5.2.4 Sequenzierung des pGex-6P-1 Konstrukts.....	82
5.3 Expression und Aufreinigung von N1'.....	83
5.3.1 Expression von N1'.....	83
5.3.2 Aufreinigung von N1'.....	84
5.4 Klonierung von N1' aus pGex – 6P – 1 Konstrukt in den Expressionsvektor pQE 30.....	86
5.4.1 Klonierung in pQE 30.....	86
5.4.2 Transformation in E. coli und Überprüfung des pQE – N1' Konstrukts .....	86
5.4.3 Sequenzierung des pQE 30 Konstrukts.....	87
5.5 Expression und Aufreinigung des N1' aus dem pQE 30 Konstruktes.....	88
5.5.1 Expression und Aufreinigung des N1' .....	88
5.6 Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von NP'.....	91
5.6.1 Amplifikation von NP'.....	91
5.6.2 Subklonierung von NP' in den Expressionsvektor pGex-6P-1.....	92

5.6.3 Transformation in E.coli und Überprüfung des pGex-6P-1 Konstruktes.....	92
5.6.4 Sequenzierung des NP'-pGex-6P-1 Konstrukts.....	93
5.7 Expression und Aufreinigung von NP'.....	94
5.7.1 Expression von NP'.....	94
5.7.2 Aufreinigung von NP'.....	95
5.8 Umklonierung von NP' aus pGex-6P-1 Konstrukt in den Expressionsvektor pQE 30.....	96
5.8.1 Umklonierung in pQE 30.....	97
5.8.2 Transformation in E.coli und Überprüfung des pQE 30 Konstrukts..	98
5.8.3 Sequenzierung des pQE 30 Konstrukts.....	99
5.9 Expression und Aufreinigung des NP' aus dem pQE 30 Konstrukts.....	99
5.9.1 Expression des NP' aus dem pQE 30 Konstruktes.....	100
5.9.2 Aufreinigung des NP'.....	100
5.10 Influenza Diagnostik aus Saliva-Proben.....	104
5.10.1 Stabilitäts- und Interaktionsprüfung von Influenza-RNA in Saliva	104
5.10.2 Bestimmung der diagnostischen Sensitivität der RT-PCR mit Saliva als Probenmaterial.....	105
5.10.3 Kultivierung von Influenza-Virus aus Saliva.....	106
6 Diskussion.....	107
7 Zusammenfassung.....	110
8 Literaturverzeichnis.....	112
9 Anhang.....	116
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	116
9.2 Tabellenverzeichnis.....	118
9.3 Abkürzungsverzeichnis.....	118
9.4 Abkürzungen der verwendeten Größenordnungen.....	121
9.5 Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren.....	121
10 Akademische Lehrer.....	122
11 Danksagung.....	123

## 1 Einleitung

Influenza-Viren sind klinisch von großer pathogener Bedeutung. Sie können eine akute Erkrankung des Respirationstraktes bewirken und sind durch eine hohe Ansteckungsrate, und den daraus resultierenden Epidemien, gekennzeichnet. Retrospektiv betrachtet, können schon Epidemien in der Antike, von Hippokrates 412 v. Chr. beschrieben, Influenza zugeschrieben werden. Als besonders tragisch verlaufende Pandemie gilt die „Spanische Grippe“, die zwischen 1918 und 1919 20 – 40 Millionen Menschen das Leben kostete. 1933 wurden zum ersten mal Influenza-Viren isoliert [Smith W. et al., 1933].



**Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenza-Viren**



## **1.1 Klassifizierung und Nomenklatur**

Das Influenza-Virus gehört zu der Familie der Orthomyxoviridae, die diesen Namen aufgrund von Interaktionen mit Mukopolysacchariden und Glykoproteinen, besonders Sialinsäure auf Mucosa, erhielten. In dieser Familie unterscheidet man 3 Genera [Fields et al., 1991], die sich in ihren Nukleo- und Matrixproteinen unterscheiden.

### **1.1.1 Influenza A- und Influenza B-Viren**

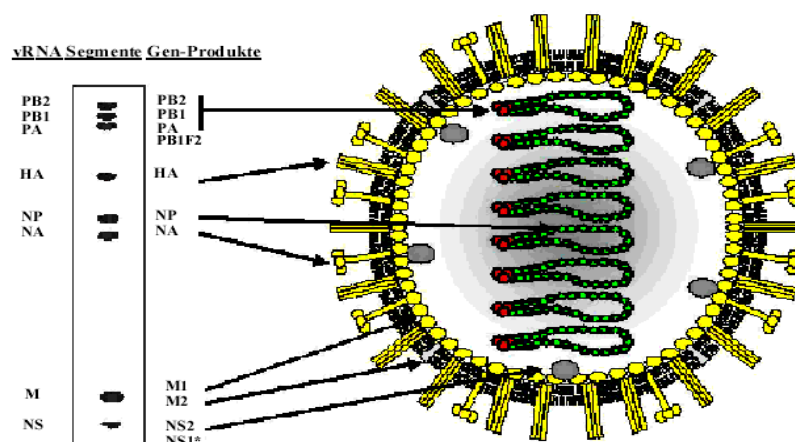
Influenza A-Viren werden weiter in verschiedene Subtypen aufgeteilt, die zwar gleiche Nukleo- und Matrixproteine besitzen, sich aber in den Hämagglutinin- (HA) und/oder Neuraminidaseproteinen (NA) unterscheiden. Man unterscheidet bisher 16 Subtypen des HA (H1 – H16) und 9 des NA (N1' – N9). Diese wurden alle aus Vögeln isoliert. Einige dieser in unterschiedlichen Kombinationen auftretenden Subtypen finden sich auch bei Säugetieren einschließlich des Menschen. Viren mit HA-Typ 1, 2, 3, 5 und 9 sowie NA-Typ 1 und 2 sind humanpathogen. Benannt werden die Subtypen mit der Typenbezeichnung A , der Spezies aus der die Erstisolation erfolgte, dem Ort der Isolation, der Nummer des Isolates, dem Jahr der Erstisolation und den H und N Subtypen. Bei Stämmen, die menschlichen Ursprungs sind, entfällt die Wirtsbezeichnung. Influenza B-Viren können bei Menschen auch eine schwere Grippe verursachen. Allerdings treten schwere Krankheitsfälle mit der Notwendigkeit von Krankenhausaufenthalten bei Influenza A Infektionen viermal häufiger auf als bei Influenza B Infektionen, die allerdings auch epidemisch verlaufen können. Daher wird die Schutzimpfung mit einer trivalenten Vakzine durchgeführt, die neben den beiden aktuell kursierenden Influenza A-Stämmen auch einen Influenza B-Stamm enthält.

## 1.2 Struktur und Charakterisierung

Influenza A-Viren sind RNA-Viren mit einem Durchmesser von 80 - 120 nm, einer pleomorphen, kugeligen Gestalt und helikaler Kapsidsymmetrie. Die Außenhülle des Influenza-Virus stammt von der Zellmembran ab und stellt eine bei der Virusreifung von dieser übernommene Lipiddoppelschicht dar. Während die Innenseite der Außenhülle von dem viralen Membran- oder Matrixprotein (M1) gebildet wird, finden sich auf der Oberfläche des Viruspartikels die stachelartig angeordneten Glykoproteine (Spikes, Peplomere) Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Ein weiteres Matrixprotein (M2) bildet eine geringe Anzahl von Poren innerhalb der Hülle [Fields et al., 1991].

Die RNA der Viren liegt als linearer Negativ-Einzelstrang (ssRNA), die in acht Segmente unterteilt ist, vor. Jedes Segment ist mit einem eigenen Nukleokapsid assoziiert. Es besteht aus dem Nukleoprotein (NP) und einem RNA-Polymerasekomplex, welcher aus den drei Polymerasen PB1, PB2 und PA aufgebaut ist.

Die RNA kodiert für insgesamt 10 Proteine, wobei die beiden kleinsten Segmente, 7 und 8, für jeweils zwei Proteine kodieren, die durch alternatives Spleißen entstehen. Im Segment 2 wurde entdeckt, dass ein um ein Nukleotid verschobener Leserahmen für ein kleines Protein, PB1-F2 kodiert, welches mit dem Auslösen von apoptotischem Zelltod in monozytären Zellen in Zusammenhang gebracht wurde [Chen W. et al., 2001].



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Influenza-Virus Partikels**  
Das PB1-F2 ist nicht berücksichtigt

### **1.3 Funktionen der viralen Proteine**

Die 10 Proteine der Influenza A Viren werden eingeteilt in [White und Fenner, 1994]:

#### **1.3.1 Nukleoproteine**

##### **1.3.1.1 Nukleoprotein (NP)**

Das NP ist gemeinsam mit dem Matrixprotein das typenspezifische Antigen. Es bildet das Nukleokapsid und bewirkt das Umschalten von der Transkription zur Replikation. Außerdem schützt es die RNA vor Nukleasen. Da die RNA nicht vollständig von NP umschlossen ist, sind Influenza-Viren, im Gegensatz zu Parainfluenzaviren empfindlich gegen RNasen.

##### **1.3.1.2 Polymerasekomplex (P)**

Der Polymerasekomplex besteht aus drei Proteinen: basisches Protein 1 (PB1), basisches Protein 2 (PB2) und dem sauren Protein (PA), die alle Kernsignale besitzen. Die Polymerase bewirkt sowohl die Transkription als auch die Replikation der viralen RNA. Weiterhin spaltet sie neu synthetisierte zelluläre mRNA's ca. 12 Nukleotide vom 5'-Cap entfernt, um den für die virale mRNA-Synthese notwendigen Primer zu beschaffen („cap- stealing“)

#### **1.3.2 Hüllproteine**

##### **1.3.2.1 Hämagglutinin (HA)**

Das HA liegt als Homotrimer vor und ist ein Transmembranprotein. Es erkennt eine sialinsäurehaltige Rezeptordeterminante, die N-Acetylneuraminsäure auf Glykokonjugaten an endosomaler Membran synthetisiert. Das HA-Molekül wird posttranslationell durch Endoproteasen in HA1 und HA2 gespalten, die über eine Disulfidbrücke assoziiert bleiben. Die proteolytische Spaltung des HA-Moleküls ist Voraussetzung für die Infektiosität der Viren.

HA1 ist ein globuläres Protein mit einer Rezeptorbindungsstelle am distalen Ende für Sialinsäure. In vitro binden HA-haltige Viren an Erythrozyten und führen zu deren Hämagglutination. Dieser Umstand verdankt HA seinen Namen

[Hirst et al., 1941].

HA2 ist helikal aufgebaut und dient mit seinen hydrophoben Domänen zur C-terminalen Verankerung des Moleküls in der Virusmembran und mit seiner N-terminalen Fusionsdomäne zur Fusion mit der Wirtszelle.

#### **1.3.2.2 Neuraminidase (NA)**

Die Neuraminidase ist ein Homotetramer, gebildet aus vier Untereinheiten die identisch aufgebaut und über Disulfidbrücken verbunden sind. Eine Untereinheit besteht aus einem substratbindenden, enzymatisch aktivem Kopfteil und einem Stiel, der mit dem N- Terminus als Signal- und Verankerungsdomäne dient. NA bewirkt eine Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Oligosacchariden auf Zelloberflächen und Glykolipiden. Sie ist dafür verantwortlich, dass Influenza-Viren zu Beginn der Infektion die Schleimschicht auf Epithelzellen durchdringen können. Weiterhin verhindert es die Selbstaggregation von Viruspartikeln und Bindung an die virusinfizierte Zelle nach Abknospen der Viruspartikel. Darüber hinaus tragen die beiden viralen Oberflächenglykoproteine HA und NA die wichtigsten antigenen Determinanten für die humorale Immunabwehr im infizierten Organismus.

### **1.3.3 Nicht-glykosylierte Proteine**

#### **1.3.3.1 Matrixproteine (M)**

Die Proteine M1 und M2 sind auf dem bicistronischen Gensegment 7 kodiert. Sie entstehen durch alternatives Spleißen durch Wirtsenzyme. Das M1-Protein ist der Innenseite der Lipidhülle angelagert. Es wird für die Freisetzung der Virionen benötigt. Das M2-Protein ist ein Transmembranprotein und bildet innerhalb der Membran Ionenkanäle aus [Fields et al., 1991], deren Funktion es ist, durch eine Ansäuerung im Endosom eine Konformationsänderung des Nukleokapsids zu bewirken, was anschließend zur Dissoziation von M1 und des Ribonukleoproteinkomplexes führt. Es ermöglicht so den Transport der RNA in den Zellkern. Die Funktion der Kanäle kann durch Amantadin und Rimantadin gehemmt werden. Diese Verbindung hat bei Influenza A-Viren eine

therapeutische Bedeutung erlangt.

### **1.3.4 Nichtstruktur-Proteine**

Die genetische Information für die Nichtstruktur-Proteine NS1 und NS2 ist auf Segment 8 lokalisiert. Auch sie entstehen durch alternatives Spleißen. Die beiden Proteine werden nicht im Virion gefunden, sondern nur in der infizierten Zelle. NS1 hemmt das Ausschleusen der viralen und zellulären mRNA aus dem Zellkern und verhindert das Spleißen der unreifen mRNA.

## **1.4 Vermehrungszyklus von Influenza A-Viren**

Orthomyxo-, Borna- und Retroviren nehmen eine Sonderstellung unter den RNA-Viren ein, da bei ihnen die Transkription und Replikation im Zellkern der infizierten Zelle erfolgt und nicht im Zytoplasma. Wirtszellen für Influenzaviren sind vor allem die Epithelien der Atemwege und die Endothelien der Blutgefäße. Die Adsorption der Influenza-Viren erfolgt über eine Bindungsstelle im HA1. Diese erkennt sialinsäurehaltige Proteine oder Lipide auf der Zelloberfläche. Nach rezeptorvermittelter Endozytose gelangt das Virus in ein Endolysosom, in dem das Milieu angesäuert wird (pH 5,5). Die dadurch verursachte Konformationsänderung des HA2 führt zur Freilegung unpolarer Aminosäuren am N-Terminus. Anschließend verschmelzen die viralen und zellulären Membranen miteinander. Das Nukleokapsid gelangt so in das Zytoplasma der Zelle.

Als Negativstrang RNA-Virus wird die Transkription des Influenza-Virusgenoms in komplementäre mRNA und cRNA durch den viralen, RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplex durchgeführt. Allerdings ist er nicht in der Lage, die mRNA-Synthese zu initiieren oder das 5'-Ende von mRNA-Molekülen durch Capping und Methylierung zu modifizieren. Daher benötigt der initiale Schritt der mRNA-Synthese einen Primer in Form eines 5'-Cap Endes. Dazu schneidet eine viruseigene Endonuklease, ein Bestandteil des viralen Polymerasekomplex, etwa 12 Nukleotide vom 5'-Cap entfernt, diesen Teil von wirtseigener mRNA ab.

Die fertige virale mRNA wird ins Zytoplasma transportiert, wo anschließend an den Ribosomen der Wirtszelle die Translation erfolgt.

Durch die Menge des vorhandenen Nukleoproteins wird das Umschalten von der Transkription zur Replikation gesteuert. Die ersten Produkte der replikativen RNA Synthese sind intermediäre, komplementäre Kopien aller viralen RNA-Segmente.

Diese Positivstränge unterscheiden sich von den Positivstrangkopien der Transkription (mRNA's) durch die Struktur ihrer Enden. Den Replikationskopien fehlt sowohl das Cap als auch der Poly(A) Schwanz. Sie dienen als Matrizen für die Synthese von Minusstrang-RNA-Segmenten, die identisch sind mit der ursprünglichen viralen RNA.

HA und NA werden am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert. Im Lumen des ER findet die N-Glykosylierung statt, die im Golgi-Apparat modifiziert bzw. weitergeführt wird. Aufgrund des ständigen Membranflusses werden die freigesetzten Golgivesikel in die Zellmembran eingebaut, so dass sich dort Bereiche der entstehenden Virushülle formen. In permissiven Zellen wird das Hämagglutinin durch zelluläre Proteasen gespalten. Die übrigen Virusproteine werden im Zytoplasma an freien Ribosomen synthetisiert.

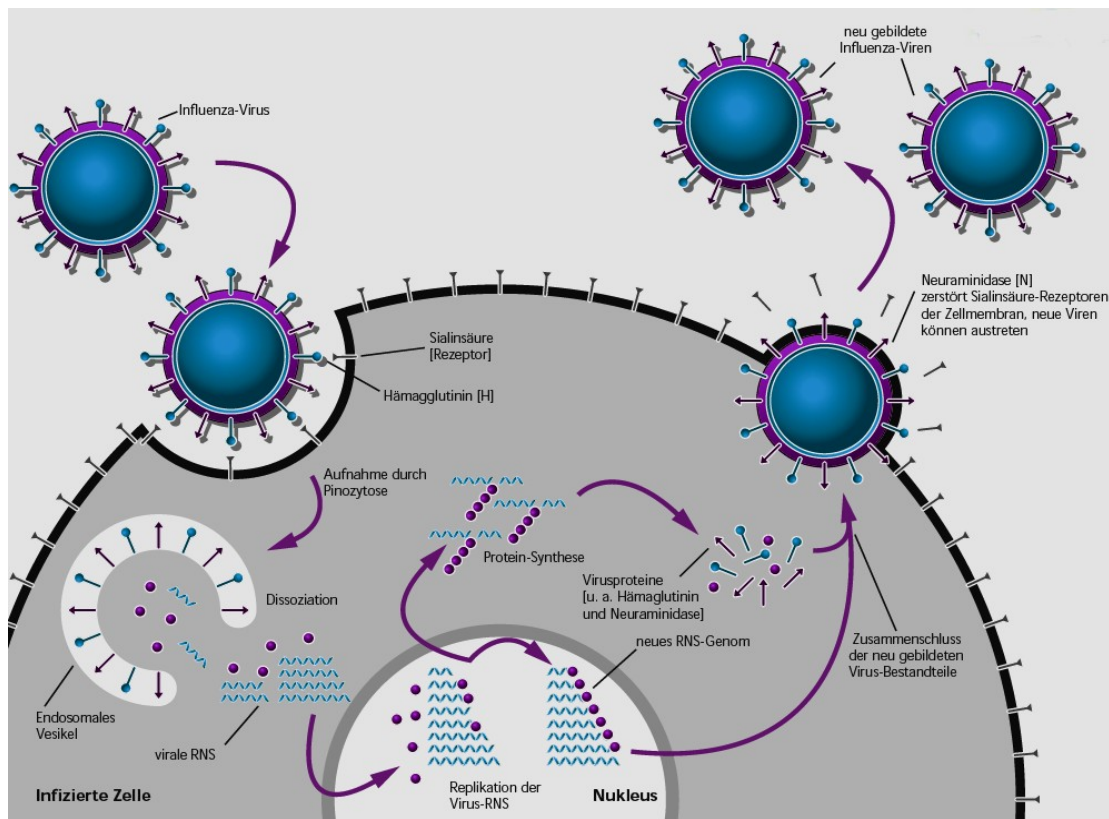
Die Nukleoproteine werden aufgrund basischer Sequenzen („nuclear transport sequence“) in den Zellkern transportiert, und es kommt zum Zusammenbau des Nukleokapsids.

An der Innenseite der Plasmamembran lassen sich die Matrixproteine nachweisen, die an die eingelagerten Hämagglutininmoleküle gebunden sind. Sie haben die Funktion, beim Zusammenbau des Virions den Kontakt zwischen den viralen Glykoproteinen in der Membran und dem Nukleokapsid zu vermitteln. Vor allem M1, welches ein Zinkfingermotiv (Bindung an Nukleinsäuren) besitzt, bindet an den Nukleokapsid-Komplex, bestehend aus Nukleoprotein, Transkriptase und der Minusstrang-RNA, der aus dem Zellkern wandert.

HA, NA und M2 wandern bevorzugt zur apikalen Zellmembran, wo der im Zellkern entstandene Komplex über das M1 an das HA-Trimer bindet.

Um replikationsfähige Virionen zu erhalten, muss sich von jedem der acht Gensegmente je eine Kopie vor der Abschnürung in einem Viruspartikel zusammen lagern. Die Freisetzung der Viruspartikel durch Abknospen an der

Plasmamembran geschieht bei polarisiert wachsenden Zellen am apikalen Zellpol.



**Abb. 3: Der Vermehrungszyklus von Influenza-Viren**

Das Virus wird durch Bindung an die Rezeptordeterminante endozytotisch aufgenommen. Nach der Membranfusion wird das RNP freigesetzt und wandert in den Nukleus. Dort kommt er zur Transkription und Replikation. mRNA wird ins Zytoplasma transportiert und translatiert. Die Glykoproteine werden zur Oberfläche transportiert, wo sie in die Plasmamembran integriert werden. In der späten Infektionsphase werden die RNP's aus dem Kern exportiert und in neue Virionen verpackt, die durch Knospung von der Zelloberfläche freigesetzt werden [Nicholson et al, 1998]

### 1.5 Antigen shift und Antigen drift

Influenza-Viren des Typs A können wegen ihrer starken antigenen Variationen der Oberflächen-Glykoproteine HA und NA immer wieder Epidemien hervorrufen, indem neu auftretende Virustypen auf eine nicht-immune Bevölkerung treffen. Fortwährend kommt es zu kleineren Antigenveränderungen (Antigen drift), die erklärt werden durch Selektion von Punktmutationen unter immunologischem Druck. Vor allem Veränderungen im

HA können weitreichende Folgen haben, da nur Antikörper gegen Hämagglutinin einen vollständigen Schutz vor einer Infektion bieten. Diese Punktmutationen können zu einer Veränderung der antigenen Epitopen führen. Zusätzlich sind N-Glykosidierungsstellen betroffen. Dadurch werden Antikörpererkennungsstellen maskiert.

Antikörper gegen Neuraminidase führen nur zu einem partiellen Impfschutz. Die Matrix- und Nukleoproteine sind für die humorale Immunabwehr nicht zugänglich aber wichtig für die zelluläre Immunabwehr.

Größere genetische Veränderungen hingegen resultieren aus dem Antigen shift. Mit diesem Begriff bezeichnet man den Austausch von kompletten RNA-Gensegmenten (Reassortment) zwischen verschiedenen Influenzastämmen bei Doppelinfektion einer Zelle. Aufgrund des segmentierten Genoms ist dieses Ereignis erheblich häufiger als eine „klassische“ genetische Rekombination.

## **1.6 Pathogenese und Klinik der Influenza-Erkrankung**

### **1.6.1 Pathophysiologie der Influenza**

Die Influenza-Viren befallen vor allem die Epithelzellen des Atemtraktes und von dort auch Endothelzellen der Blutgefäße. Die Ausbreitung im Atemtrakt erfolgt entweder von Zelle zu Zelle, durch Atmung über Aerosole in andere Bereiche des Atemtraktes oder mit dem auf den Epithelien befindlichen Mukos durch Ziliarbewegung. So werden die Bronchien, die tiefere Trachea und die Lunge infiziert. Durch die Zerstörung von Epithelzellen kommt es zu einer verminderten Produktion von Bestandteilen der unspezifischen humoralen Immunabwehr und daher können Bakterien, im Sinne eines synergistischen Effektes, einfacher kolonisieren [Tashiro M., Klenk H.D., Rott R. et al.].

Die Infektion der Gefäßendothelien kann zur Störung der Gefäßpermeabilität, zu massiven Gerinnungsstörungen und durch Überwindung der Blut-Liquor-Schranke zu ZNS-Schäden führen [Togashi et al., 2000]; [Togashi et al., 2002]. Herzinfarkte und Schlaganfälle sind während Influenzaepidemien häufiger



[Bova et al., 1996], ebenso treten sie bei Geimpften seltener auf als bei Nichtgeimpften [Nichol et al., 2003].

### 1.6.1.1 Gerinnungssystem

Während einer Influenzainfektion kann es durch die Endotheliotropie des Virus zu einer Schädigung des Endothels kommen. Gleichzeitig kann es zu einer Hyperkoagulabilität mit einem Anstieg des Fibrinogen-Spiegels im Blut, u.a. durch einen direkten Befall der Leber durch Influenza kommen. Es wurde auch die Dekompensation einer Leberzirrhose bei Influenza beschrieben [Duchini et al., 2000]. Zudem kann das Virus auch das Herz direkt betreffen (siehe unten), was in einer Reduktion des Herzminutenvolumens und der Auswurfleistung des Herzens münden kann. Hiermit greift das Influenzavirus an allen drei Schenkel der bekannten Virchow-Trias (Gefäßwand, Blutgerinnung und Blutströmung), die die Voraussetzungen für einen ungestörten Blutfluss erklärt, an. Damit lässt sich erklären, warum es bei Influenza vermehrt zu Herzinfarkten und Schlaganfällen kommt und somit zu einer Übersterblichkeit bei Influenza vor allem bei älteren, gefäßerkrankten Menschen.

### 1.6.2 Klassische Influenza

#### 1.6.2.1 „Sudden onset“

Typisch beginnt eine Influenza plötzlich (*sudden onset*), wenige Stunden bis Tage nach dem Eindringen des Virus in den Organismus, d.h. die Symptome einer Influenza treten schlagartig und meist so massiv auf, dass Patienten aus völliger Gesundheit heraus plötzlich stark erkranken.

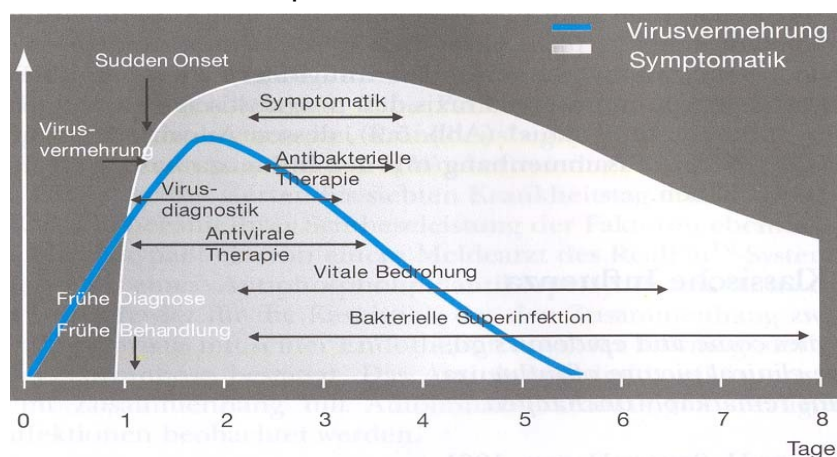


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Influenza [Lange, W. und Vogel, G.E., 2004]

### 1.6.2.2 Symptomatik

Die Leitsymptome zu Abgrenzung gegenüber anderer Akut-Respiratorischer-Erkrankungen (ARE) sind plötzlicher Beginn, Fieber und Husten.

Zeichen, die auf eine Influenza hindeuten, sind:

- Allgemeinsymptome, wie Abgeschlagenheit, Leistungsknick und Lustlosigkeit
- diffuse, bohrende, dumpfe Kopfschmerzen, die von den Augen nach parieto-temporal ziehen
- ausgeprägte Photophobie
- Überempfindlichkeit gegenüber akustischer Reize
- Myalgien in fast allen Körperregionen, besonders lumbosakral
- reflektorische Verspannung der Nackenmuskulatur
- frühzeitige Erhöhung der Körpertemperatur: rascher Fieberanstieg bis zu  $41^{\circ}\text{C}$ , Kontinua über einige Tage, anschließend absinken der Temperatur in drei bis fünf Tagen
- Übelkeit mit Appetitlosigkeit, Trinkunlust und Nausea mit Erbrechen und Durchfällen
- Kreislaufschwäche
- Konjunktivitis
- Patient ist und fühlt sich verschnupft, verheult und richtig krank
- Lidränder sind durch ein zähes Sekret krustig verklebt
- periorbital aufgedunsenes Gesicht
- die Haut bietet ein lilarotes Kolorit, Lippen und Schleimhäute sind zyanotisch verfärbt

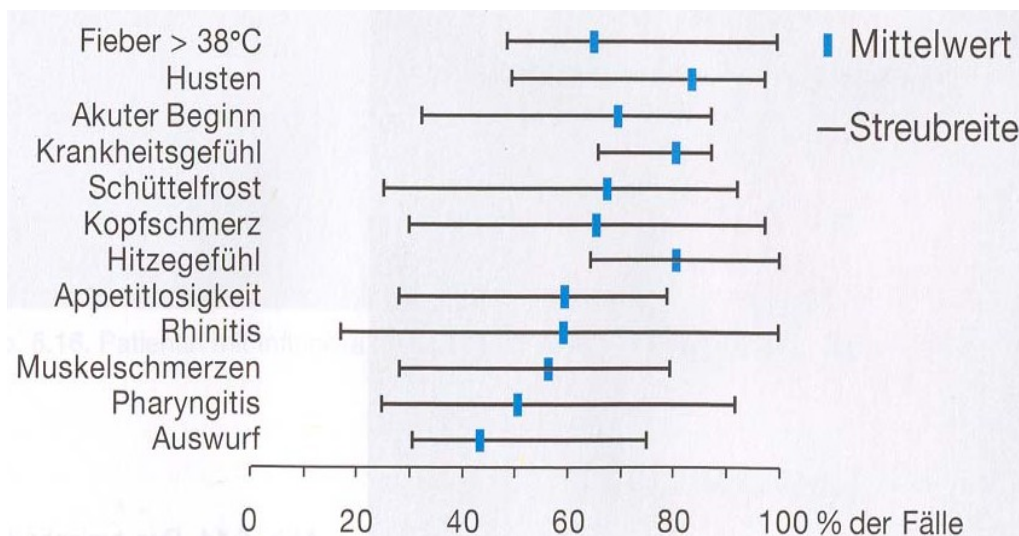


Abb. 5: Inzidenz der Symptome bei Influenza A (Erwachsene) [Smith W. et al., 1933]

### **1.6.2.3 Klinische Befunde**

- Hyperämie der Schleimhaut von Mund und Rachen
- Livider, rautenförmiger Rachenring, aus dem die Uvula prall ödematös vergrößert imponiert und oft bis an den Zungengrund reicht. Wird als "flammende Röte" bezeichnet
- vorwiegend bei jüngeren Patienten Schwellung der Halslymphknoten
- sonographisch vergrößerte Milz
- ein klein fleckiges, makulöses Exanthem kann das gesamte Integument für ein bis zwei Tage befallen
- Tachypnoe mit Dyspnoe, mitunter zu diesem Zeitpunkt schon ein leichtes Giemen und Pfeifen auskultierbar
- in der frühen Phase eine subklinische Lungenbeteiligung, verifizierbar durch den alveolokapillären Diffusionsgradienten
- Bradykardie, die nicht zu der Höhe des Fiebers passt
- Laryngitis und Tracheitis mit Wundgefühl
- quälender, bellender Husten
- Heiserkeit bis hin zur totalen Aphonie

### **1.6.3 Influenza bei Schwangeren**

Schwangere sind besonders gefährdet, schwer oder tödlich zu erkranken, besonders im dritten Trimenon und im Frühpuerperium. Eine influenzabedingte kardiopulmonale Morbidität bei Schwangeren von 10,5 pro 10000 Frauenmonaten steht eine von 1,91 bei Nichtschwangeren und eine von 1,16 bei Frauen nach der Entbindung gegenüber [Neuzil et al., 1998]. Von 10000 Frauen ohne sonstiges Risikoprofil mussten 25 in ihrem letzten Trimenon wegen einer kardiopulmonalen Erkrankung bei Influenza behandelt werden.

### **1.6.4 Influenza bei Kindern**

Während der Epidemie des Winters 2002/03 waren Kinder am häufigsten an Influenza erkrankt. In anderen Epidemien hatten sie eine Vorreiterstellung, da sie als erstes betroffen waren und dann die Erkrankung in ihre Familie, vor allem zu den Großeltern, trugen.

#### **1.6.4.1 Symptomatik**

Bei fast der Hälfte der infizierten Kindern verläuft die Infektion ähnlich wie bei den Erwachsenen subklinisch ab. Manifeste Influenzafälle verlaufen insgesamt ähnlich wie bei den Erwachsenen. Viele Kinder haben besonders hohes Fieber und laufen damit Gefahr, einen Fieberkrampf zu erleiden, mit dem bei 20-50 % der Fälle gerechnet werden muss.

Initial besteht häufig ein Angstgefühl, das sich in einer plötzlichen Niedergeschlagenheit und Hilfsbedürftigkeit äußert.

Kleinkinder fallen durch eine erhöhte Schläfrigkeit, bis hin zu einem Dämmerzustand, auf.

Bei über 40% stehen gastrointestinale Symptome im Vordergrund. Häufige Gründe für eine Klinikeinweisung sind Krupp, Pneumonie oder andere akute Atemwegszustände. Die häufigste Komplikation ist die Otitis media [Nicholson et al, 1998]; [Brady et al., 1998]. Eine besondere Gefahr bei Kindern ist die influenzaassoziierte akute Enzephalopathie, die nicht selten tödlich endet [Togashi et al., 2000]; [Togashi et al., 2002].

#### **1.6.5 Influenza bei alten Menschen**

Die Sterblichkeit an Influenza betrifft in interpandemischen Zeiträumen zu 95 % Menschen über 60 Jahren [Sprenger et al., 1993]. Über die Hälfte der Verstorbenen über 65 Jahren lebten in Heimen. Daneben gehört zu den wichtigsten Risikofaktoren das im Alter reduzierte Immunsystem und chronische Grundkrankheiten, die bei einer Infektion zu einer schnellen Dekompensation neigen.

##### **1.6.5.1 Symptomatik**

Die Klinik bei alten Menschen, die mit Influenza infiziert sind, zeigt einige Besonderheiten, auf die zu achten sind, weil die von jungen Patienten gewohnten Symptome bei Älteren nicht selten fehlen oder schwächer ausgeprägt sind. Daher muss während einer Influenzaepidemie jede Verhaltensänderung des Patienten an eine Influenza denken lassen:

- Fieber kann fehlen oder es tritt nur eine leichte Temperaturerhöhung auf
- der plötzliche Beginn fehlt häufig, meist eher schleichend

- der Patient kann nur durch ein Symptom auffallen: stärkere Verwirrtheit als üblich, veränderter Blutdruck, eine Hypokaliämie, eine Exsikkose, Gerinnungs- oder Blutzuckerschwankungen, Neigung zur Opstipation, leichter Kopfdruck, gerötete Augen oder Gliederschmerzen

### **1.6.6 Rekonvaleszenz**

Bei einer unkompliziert verlaufenden Influenza tritt nach spätestens einer Woche die Entfieberung ein. Anschließend verschwinden alle Symptome der Erkrankung rasch, mit der Ausnahme der so genannten postgrippalen Asthenie. Damit ist die über Wochen, manchmal sogar Monate anhaltende, rasche Erschöpfbarkeit bei geringster körperlicher Anstrengung gemeint. Begleitend treten starke Schweißausbrüche auf und zeitweise fällt die Körpertemperatur nicht in den Normbereich sondern persistiert als Kontinua über Wochen. In dieser Zeit sind wiederholt deutliche Hypotoniephasen nachweisbar.

### **1.6.7 Komplikationen der Influenzaerkrankung**

#### **1.6.7.1 Herzerkrankungen**

Bei einem akuten Virusinfekt kommt es mit einer Inzidenz von 1-5 % zu einer myokardialen Beteiligung. Die Virusmyokarditis ist eine häufig übersehene Komplikation der Influenza.

##### **1.6.7.1.1 Symptomatik und klinische Befunde**

Folgende Symptome weisen auf eine kardiale Beteiligung hin:

- meist subakuter und uncharakteristischer Verlauf
- allgemeine körperliche Abgeschlagenheit, Schwäche, Müdigkeit
- Palpationen, uncharakteristische linksthorakale Beschwerden
- eventuell ein Reibegeräusch auskultierbar

##### **Virusmyokarditis und Kardiomyopathie**

Zu den oben genannten allgemeinen Symptomen bei einer kardialen Beteiligung kommen möglicherweise noch ein neu aufgetretener dritter Herzton, im weiteren Verlauf auftretende Herzrhythmusstörungen und eine reduzierte

körperliche Belastbarkeit.

Laut der Konsensuskonferenz Myokarditis - dilatative Kardiomyopathie (1995) bleibt eine Virusmyokarditis im Zusammenhang mit einer Virusgrippe meist unerkannt und heilt häufig spontan aus.

Die kardiale Beteiligung bei einer Virusgrippe verläuft jedoch häufiger als Perikarditis und seltener als Myokarditis.

#### Perikarditis

Hier kommen zu den typischen Symptomen bei einer Herzbeteiligung noch ein Perikarditis-typisches EKG mit ST-Senkungen in den Ableitungen III und aVF sowie monophasische ST-Hebungen in V1-V3. Zusätzlich kann ein Perikarderguß auftreten.

#### Myokardinfarkt

Wie unter 1.6.1 schon erwähnt kommt es bei Influenzainfektionen aufgrund der Endothelbeteiligung und den Gerinnungsstörungen zu einem erhöhten Infarktrisiko.

Akute respiratorische Infektionen können bei Personen ohne klinische Risikofaktoren in einem Zeitraum von zwei Wochen zu einem erhöhten Infarktrisiko führen [Meier et al., 1998]. Hiernach hatten Infarktpatienten signifikant häufiger innerhalb von zehn Tagen vor dem Infarktereignis eine akute respiratorische Infektion als Kontrollpatienten (relatives Risiko 2,7)

#### 1.6.7.1.2 Diagnostik

##### EKG-Befunde

- Abflachung der T-Wellen
- unspezifische ST-Streckenveränderungen
- Ruhetachykardie
- neu aufgetretene Herzrhythmusstörungen
- Erregungsrückbildungsstörungen
- neu aufgetretene inkomplette oder komplette Schenkelblöcke, SA- oder AV-Blockierungen

Langzeit-EKG oder Event-Recorder

- häufige Extrasystolen und in Serie
- intermittierendes Vorhofflimmern

Echokardiographie

- Dilatation des linken Ventrikels
- eingeschränkte linksventrikuläre Funktion, Auswurffraktion < 55 %
- neu aufgetretene regionale Wandbewegungsstörungen
- Dilatation des rechten Ventrikels
- Perikarderguß
- intrakavitäre Thromben
- Vegetationen an den Herzklappen
- paravalvuläre Abszeßbildungen

#### **1.6.7.2 Pneumonie**

Es handelt sich hierbei um ein gemischt viral-bakterielles Geschehen. Die Vorstellung ist, dass durch die virusbedingte Zellzerstörung im Respirationstrakt den Bakterien die Voraussetzung zur raschen Vermehrung und zur Infektion bereitet wird. Synergistisch wirkt aber auch die Besiedelung mit Bakterien, die mit ihren proteolytischen Enzymen die Reifung neu gebildeter Viruspartikel durch Spaltung des Vorläufer-Hämagglutinins HA in HA1 und HA2 fördern, wie im Mausmodell gezeigt wurde [Rott et al., 1988]. Die häufigsten Superinfektionen bei einer Influenza werden durch  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* und *Chlamydia pneumoniae* verursacht. Selten tritt eine reine, schwer akut verlaufende, Viruspneumonie auf. Vermutlich wird sie durch eine besonders hohe Viruskonzentration bedingt. Die Viruspneumonie verläuft foudroyant, weil die Endothelien besonders durchlässig werden, so dass schon anfangs ein bedrohliches Ödem entsteht. In den alveolären Kapillaren werden Fibrinthromben gefunden, ferner Hämorrhagien und Nekrosen.

##### **1.6.7.2.1 Klinik**

Bei der Pneumonie handelt es sich um die häufigste Komplikation. Sie kündigt sich an, wenn Symptome wie Fieber, Dyspnoe, Husten, Zyanose und

allgemeine Schwäche sich nicht bessern, sondern eher progredient sind.

#### 1.6.7.2.2 Diagnostik

Kommt es zu einer prolongierten Symptomatik, sind kurzfristige Verlaufsbeobachtungen von Klinik mit Labor und eine Röntgen-Thorax-Aufnahme indiziert, sowie die schnelle diagnostische Aufbereitung des Sputums. Häufig tritt ein frisches Pleurareiben oder eine Infiltration bei der Auskultation auf. Initial tritt bei einer Superinfektion eine ödematöse Entzündung der Bronchialschleimhaut auf, die kein spezifisches radiologisches Korrelat im Röntgen-Thorax besitzt. Kommt es jedoch zu einer ausgeprägten inflammatorischen Imbibition des peribronchialen Gewebes, lassen sich im Verlauf der kleinen Bronchialeinheiten entsprechend streifige Transparenzminderungen mit Betonung der basalen Lungenabschnitte erkennen, so genannte "tram track signs". Neuerdings wird vermehrt zur Diagnostik die hochauflösende Computertomographie durchgeführt.

Die schwere akute Viruspneumonie zeigt sich durch eine rasch progrediente Dyspnoe und Zyanose. Auskulatorisch fallen, sich diffus ausbreitende, feuchte Rasselgeräusche über eine zunehmend nass werdende Lunge mit aufsteigender Dämpfung auf. Es tritt eine ausgeprägte Hypoxie auf. Das Röntgenbild zeigt das Vollbild eines klassischen Stauungsödems.

#### 1.6.7.3 Komplikationen der oberen Atemwege

In den Epithelien der Tuba Eustachii und der Nasennebenhöhlen treten die gleichen pathophysiologischen Vorgänge wie im Tracheobronchialtrakt auf. Dies ebnet dort einer bakteriellen Infektion den Weg. Eine Otitis media acuta verläuft synchron. Daher kann aus dem primär durch Influenza-Viren entstehende virale Bild mit blutgefüllten Bläschen auf dem Trommelfell und im äußeren Gehörgang die bakterielle Erkrankung entstehen. Ohrenscherzen und Kopfscherzen müssen stets zu Beginn diagnostisch verfolgt werden. In mehreren Impfstudien konnte gezeigt werden, dass bei geimpften Kindern die Otitis media erheblich seltener auftritt als bei nicht geimpften.

#### 1.6.7.4 Reye-Syndrom

Diese Komplikation tritt bei Kindern und Adoleszenten auf, mit einer



Wahrscheinlichkeit von drei bei 100000 Influenzaerkrankten.

Das Reye-Syndrom beginnt plötzlich mit Erbrechen, Übelkeit und zentralen Symptomen wie Konzentrationsstörungen, Desorientiertheit und anderen Zeichen einer Enzephalopathie. Es kann in einem akuten Leberversagen enden. Laborchemisch fallen eine Hypoglykämie, ein leicht erhöhtes Bilirubin und initial ein Anstieg der Transaminasen und des LDH auf [Vogel und Lange et al., 1999]. Diese Veränderungen werden auch bei anderen Virusinfektionen beobachtet und werden in Zusammenhang mit der Einnahme von Acetylsalicylsäure gebracht, weshalb diese nicht mehr bei Kindern und Jugendlichen bei Influenzainfektionen gegeben werden sollen.

#### **1.6.7.5 COPD-Exazerbation**

Bei Grundkrankheiten muss mit besonderen Komplikationen gerechnet werden. So kommt es bei einer Influenzainfektion zu einer Häufung von COPD-Exazerbationen [Rohde et al., 2001].

#### **1.6.7.6 Pneumokokkenmeningitis**

Während einer Influenzaepidemie muss vermehrt mit einer Meningitis, ausgelöst durch Pneumokokken, gerechnet werden. Diese Meningitis kann akut beginnen.

#### **1.6.7.7 Bauchgrippe**

Sehr häufig zu Beginn einer Influenza sind gastrointestinale Symptome wie Nausea, Inappetenz und Vomitus. In der Sonographie erkennt man flüssigkeitsgefüllte, hypermobile Dünndarmschlingen. Bakterielle Lokalherde können durch eine Influenza aktiviert werden. So häuften sich in einer der vergangenen Epidemien die Fälle akuter Appendizitiden.

#### **1.6.8 Übersterblichkeit**

Durch Influenza können gerade noch kompensierte Organ- und Stoffwechselerkrankungen sowie latente Infektionen zur Exazerbation gebracht werden. Dazu gehören Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Gefäßsklerose, Leberzirrhose sowie Herzerkrankungen. Bei oral antikoagulierten Patienten

muss auf plötzlich auftretende, gefährliche Blutungen geachtet werden.

Alter (Jahre) der Patienten

Anteil an Übersterblichkeit (%)

< 60	5
60-69	12
70-79	29
>80	54

**Tab. 1: Altersverteilung der Übersterblichkeit** [Sprenger et al., 1993]

## 1.7 Immunantwort gegen Influenza A-Viren

Die viralen Oberflächenproteine werden zuerst vom Immunsystem erkannt. Die Immunantwort während einer akuten Influenzainfektion wird sowohl von einer spezifischen zellulären Antwort als auch durch die Produktion von Antikörpern gegen die Glykoproteine geprägt. B-Lymphozyten werden durch Lymphokine der T-Helfer-Zellen zur Antikörperproduktion angeregt. Influenza A-induziertes Interferon wird einen Tag nach der Infektion im Serum und Respirationstrakt gefunden und dient auf humoraler Ebene der ersten Abwehr. Ab dem 7. Tag verleiht vor allem lokal produziertes IgA Schutz für die nasalen Schleimhäute. Wie auch bei den Immunglobulinen im Serum (IgG, IgM), können nur Antikörper gegen HA und in geringerem Maße gegen NA die Infektiosität des Virus herabsetzen. Sie verhindern die Adsorption der Viren und fördern die Aggregation der Partikel. Damit werden sie für phagozytierende Zellen wie Makrophagen opsoniert (Fc-Rezeptor) und für die komplementvermittelte Lyse auf der Zelloberfläche vorbereitet. Ak gegen HA und NA sind Hauptfaktoren der Resistenz. Die eher kurzlebigen zytotoxischen T-Zellklone beenden die akute Infektion. Selbst nach Impfungen steigt die Zahl der zytotoxischen T-Zellen nur um 5% [Diepersloot R.J. et al., 1989].

## 1.8 Diagnostik bei Influenza

Die Diagnose von Influenzainfektionen stellt bei sporadischem Auftreten ein Problem da, da das klinische Bild schwer von anderen respiratorischen Erkrankungen abgegrenzt werden kann. Trotzdem wird die Diagnose primär klinisch gestellt. Aus voller Gesundheit treten bei den Patienten plötzlich systemische Symptome wie Schüttelfrost, Fieber über 38°C, Kopfschmerzen, Muskel- und Gliederschmerzen sowie starke Abgeschlagenheit begleitet von lokalen Symptomen wie Husten, Heiserkeit und Halsschmerzen auf. Bei der körperlichen Untersuchung fallen höchstens eine Bindehautentzündung, eine gerötete Rachenschleimhaut und als Ausdruck einer Bronchitis trockene Rasselgeräusche über den Lungen auf. Aufgrund dieser Symptome wurden die Nicholson Kriterien entwickelt, die eine Sensitivität und Spezifität von 70 % für die Diagnose Influenza aufweisen.

Hauptkriterien
Influenza in der Region
plötzliche Erkrankung
Fieber/Schüttelfrost
zwei der folgenden Symptome
Muskel- und Gliederschmerzen
Müdigkeit und Abgeschlagenheit
Kopfschmerzen
Husten
Heiserkeit
Bettlägrigkeit

**Abb. 6: Nicholson Kriterien**

Alle Hauptkriterien müssen erfüllt sein und zusätzlich mindestens zwei Symptome

Labormedizinisch stehen mehrere Diagnosemöglichkeiten zur Verfügung.

Der Goldstandard stellt die Virusanzucht in Zellkulturen (MDCK-Zellen, Trypsin) oder in embryonierten Hühnereiern da. Als Probenmaterial dient Rachenspülwasser, Sputum oder ein Nasen-/Rachen-Abstrich. Nach ein bis zwei Tagen kann dann immunhistochemisch auf Virusantigen getestet werden.

Die klassische serologische Diagnostik umfasst die Komplementbindungsreaktion (KBR) und den Hämagglutinationshemmtest (HHT). Außerdem besteht die Möglichkeit des Nachweises von IgA und IgG mittels indirekter Immunfluoreszenz und ELISA.

Auf molekularbiologischer Ebene stehen die Multiplex-RT-PCR und so genannte „PCR-Schnelltests“ zur Verfügung.

In den letzten Jahren wurden auch Schnelltests entwickelt, die direkt im Abstrichmaterial Antigene nachweisen können. Ihre Spezifität und Sensitivität schwanken allerdings beträchtlich. Außerdem liefern sie vor allem bei älteren Patienten häufig falsch negative Ergebnisse.

Test	<b>BD Directgen FLU AB</b>	<b>BD Directgen Flu A</b>	<b>Quick Vue Influenza</b>	<b>Flu OIA</b>	<b>NOW Flu-A &amp; Flu- B</b>
Firma	Becton Dickinson	Becton Dickinson	Quidel Corp.	Thermo Biostar	Binax
Sensitivität IV-A	86,2 %	91,0 %	73,0%	gemittelt 78,0 %	82,0 %
IV-B	80,8 %	nein	nein		71,0 %
Spezifität IV-A	90,7 %	95,0%	96,0%	gemittelt 71,5 %	94,0 %
IV-B	99,5 %	nein	nein		97,0 %
Nachweis von:	IV-A & IV-B	IV-A	IV-A & IV-B	IV-A & IV-B	IV-A & IV-B
AB-Differenzierung	ja	nein	nein	nein	ja, da 2 verschiedene Tests

**Tab. 2: verschiedene Schnelltests und deren Charakteristika**

IV-A = Influenza- Virus A; IV-B = Influenza- Virus B

Wichtigste Aufgabe der Labordiagnostik ist die frühzeitige Erfassung einer beginnenden Grippewelle. Daher wird am Anfang einer Grippewelle durch serologische Feintypisierung und Charakterisierung der Oberflächenglykoproteine mittels PCR und Sequenzanalyse das isolierte und angezüchtete Virus typisiert. Ist die Grippewelle voll ausgebrochen, korrelieren klinische Diagnose und Labordiagnose in 80 bis 85 Prozent, was eine weitere

Individualdiagnose überflüssig macht und den Behandlungsbeginn nur unnötig verzögern würde.

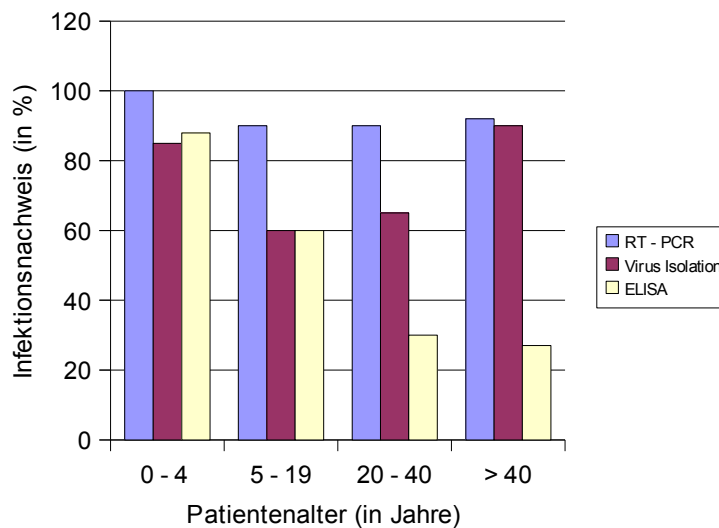


Abb. 7: Abhängigkeit des Patientenalters auf das Testergebnis

## 1.9 Therapie einer Influenza- Infektion

### 1.9.1 Amantadin und Rimantadin

Amantadin ist nur gegen Influenza A-Virus wirksam und aufgrund der schnellen Resistenzbildung nicht mehr Mittel der Wahl bei einer Infektion.

Amantadin hemmt das M2-Ionenkanalprotein und verhindert so das Uncoating der Viren [Fields et al., 1991]. Es wird unverändert renal ausgeschieden.

Bekannte Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden, Reizbarkeit und Erregung bis hin zu Krampfanfällen. Amantadin verstärkt die Wirkung von anticholinergen Pharmaka.

Kontraindikationen sind Verwirrheitszustände, Anfallsleiden, Gravidität/Stillzeit, höhergradige Nieren- und Herzinsuffizienz und ein bestehendes Engwinkelglaukom.

Rimantadin besitzt eine vergleichbare antivirale Aktivität und einen gleichen Wirkungsmechanismus wie Amantadin, ist jedoch weniger toxisch.

### **1.9.2 Neuraminidase-Inhibitoren**

NA-Inhibitoren blockieren die Virus-Neuraminidase und unterbinden Virusaufnahme sowie die Freisetzung neu gebildeter Viruspartikel von der infizierten Zelle. Sie sind gegen alle neun bekannten NA-Subtypen des Influenza A-Virus und gegen die Neuraminidase des Influenza B-Virus wirksam. Die Hemmstoffe weisen eine hohe Selektivität für die virale NA auf, so dass die menschliche NA in therapeutischen Dosierungen nicht gehemmt wird.

Die NA-Hemmer reduzieren die Viruslast deutlich, so dass die Dauer der Influenza verkürzt und die Schwere der Krankheit gemildert wird.

Die Therapie sollte innerhalb der ersten 48 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome einsetzen. Wird die Therapie innerhalb der ersten 12 Stunden begonnen, kann die Krankheitsdauer um 3,1 Tage gesenkt werden. Eine aktuelle Meta- Analyse [Kaiser et al., 2003] konnte zeigen, dass infektiöse Komplikationen der unteren Atemwege, die einer Antibiotikatherapie bedurften, unter Einsatz der NA-Hemmer um 55 % gesenkt werden. Des weiteren wurde die Hospitalisierungsrate um 59 % gemindert.

Die Gruppe um Treanor et al. zeigte, dass die Intensität der Symptome um 40 %, die Gefahr von Sekundärkomplikationen um 50 % reduziert wird [Treanor et al., 2000].

Eine Resistenzentwicklung der Influenza-Viren gegen die NA-Hemmer konnte bisher nicht beobachtet werden.

#### **1.9.2.1 Zanamivir**

Zanamivir wird als Pulver inhaliert. Es ist zugelassen für die Therapie der Influenza A und B bei Menschen ab 12 Jahren. Es sind keine spezifischen Nebenwirkungen bekannt.

Bei Patienten, die unter einer Dauertherapie mit inhalativen Bronchodilatoren stehen, sollten diese vor der Einnahme des Virostatikums anwenden, da es sonst zu einer Bronchialobstruktion kommen kann.

#### **1.9.2.2 Oseltamivir**

Oseltamivir wird aufgrund der guten oralen Bioverfügbarkeit als Kapsel gegeben. Auch als Suspension steht es zur Verfügung. Oseltamivir ist zur

Therapie der Influenza A und B bei Menschen ab 1 Jahr zugelassen.

Als Nebenwirkung treten gastrointestinale Beschwerden auf, die durch die Einnahme des Medikaments während der Mahlzeit weitgehend verhindert werden können.

### **1.9.3 Empfehlung zur Therapie der Influenza**

Mittel der Wahl bei einer klinisch und/oder labormedizinisch gesicherter Influenza- Infektion sind die Neuraminidase-Inhibitoren, bei denen Oseltamivir den höheren Stellenwert einnimmt.

Die Therapie sollte in den ersten 48 Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome beginnen.

Indiziert ist die antivirale Therapie insbesondere bei Risikopatienten (Patienten mit chronischen Grundkrankheiten, wie Lungen-, Herz-, Leber- und Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus) und bei älteren Menschen sowie bei Kindern und Erwachsenen mit Kontakt zu Risikopatienten. Trotz der derzeit noch unzureichenden Datenlage ist es sinnvoll, auch immunsupprimierte Patienten (z.B. HIV-Infizierte, Tumorpatienten, Patienten unter Chemotherapie, Dialysepatienten) antiviral zu behandeln.

Nicht antiviral behandelt werden sollten immunkompetente Patienten mit nicht fieberhaften Erkrankungen oder Patienten, bei denen der Beginn der klinischen Symptomatik länger als 2 Tage zurückliegt.

## **1.10 Prophylaxe einer Influenzainfektion**

### **1.10.1 Impfung**

Der Impfstoff wird jedes Jahr, in Abhängigkeit zu den aufgetretenden Virusstämmen, neu zusammengestellt. Er enthält immer 2 Vakzine des Influenza A-Virus und ein Vakzin des Influenza B-Virus.

Im Winter 2008/09 war der Impfstoff wie folgt zusammen gesetzt:

A(H3N2): A/Brisbane/10/2007 oder ähnliche Varianten

A(H1N1): A/Brisbane/59/2007 oder ähnliche Varianten

B: B/Florida/4/2006 oder ähnliche Varianten

#### **1.10.1.1 Empfehlungen der Ständigen Impfkommission am RKI**

Die Empfehlung für eine Impfung besteht grundsätzlich bei Personen über 60 Jahren, Kindern, Jugendliche und Erwachsene mit erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines Grundleidens, wie z.B. chronische Lungen-, Herz-Kreislauf-, Leber- und Nierenkrankheiten, Diabetes und andere Stoffwechselkrankheiten, Immundefizienz, HIV-Infektion, Bewohner von Alters- oder Pflegeheimen, Personen mit erhöhter Gefährdung, z.B. medizinisches Personal, Personen in Einrichtungen mit umfangreichem Publikumsverkehr sowie Personen, die als mögliche Infektionsquelle für von ihnen betreute ungeimpfte Risikopersonen fungieren können. Diese Empfehlungen wurden bisher nur unzureichend umgesetzt, wie die Impfraten von ca. 15 % bei Beschäftigten im Gesundheitsdienst und von 50 % bei chronisch Kranken zeigen [Robert-Koch-Institut, 2002].

#### **1.10.2 Medikamentöse Prophylaxe**

In Deutschland sind hierfür Oseltamivir und Amantadin zugelassen. Bei einer Postexpositionsprophylaxe liegt die Wirksamkeit von NA-Hemmern bei 80 – 90 %. Bei Anwendung zur saisonalen Prophylaxe bei nicht geimpften Personen erreichen sie eine Reduktion der Erkrankungshäufigkeit um 70 – 90 %. Allerdings sollte die medikamentöse Prophylaxe kein Ersatz, sondern eine wirkungsvolle Ergänzung zur Immunprophylaxe sein.

Während einer Epidemie bestehen folgende Indikationen

Postexpositionsprophylaxe: ungeimpfte Personen nach engem Kontakt mit Erkrankten, wenn innerhalb von 48 h mit der Chemoprophylaxe begonnen werden kann.

Saisonale Prophylaxe: nur zu erwägen, wenn die im Impfstoff enthaltenen Virusstämme nicht mit den zirkulierenden Viren übereinstimmen, insbesondere im Falle einer Pandemie.



<b>Virostatikum</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Dosis</b>	<b>Anmerkungen</b>
Oseltamivir	ab 13 Jahre	75 mg/ Tag über 7 Tage	Dosisanpassung bei Kreatinin-Clearance 10-30 ml/min auf 1 mal 75 mg jeden 2. Tag oder 30 mg Suspension 1 mal tägl.
Zanamivir	ab 5 Jahre	1 mal 10 mg/Tag über 10 Tage	
Amantadin	1 – 9 Jahre	2 mal tägl. 2,5 mg/kg/Tag	Wirkt nur gegen Influenza A
	Kinder ab 10 Jahre	2 mal tägl. 50mg/Tag über 10-20 Tage	Dosisreduzierung bei eingeschränkter Nierenfunktion
	Erwachsene bis 64 J.	2 mal tägl. 100 mg/Tag über 10-20 Tage	Schnelle Resistenzentwicklung
	Erwachsene über 65 J.	1 mal tägl. 100 mg über 10-20 Tage	

**Tab. 3: Empfohlene antivirale Medikamente zur Prophylaxe der Influenza**

## 1.11 Epidemiologie der Influenzainfektion

### 1.11.1 Historische Pandemien

Aufgrund der Möglichkeit ganze RNA-Segmente auszutauschen, treten beim Influenza- Virus regelmäßig Pandemien auf. In der folgenden Abbildung sind

einige aufgezählt.

<b>Virustyp</b>	<b>Antigenformel</b>	<b>Beginn</b>	<b>Bezeichnung</b>
A2-Asian-like	H2N2	1889	
A3-Hongkong-like	H3N8	1900	Hongkong Grippe
A1-swine-like	H1N1	1918	Spanische Grippe
A2-Asia	H2N2	1957	Asiatische Grippe
A3-Hongkong	H3N2	1968	Hongkong Grippe
A1-UdSSR	H1N1	1977	Russische Grippe
A1-Mexiko	H1N1(2009)	2009	Schweine-Grippe

**Tab. 4: Historische Pandemien und Virustyp**

### 1.11.2 Influenza-Aktivität in Deutschland in der Saison 08/09

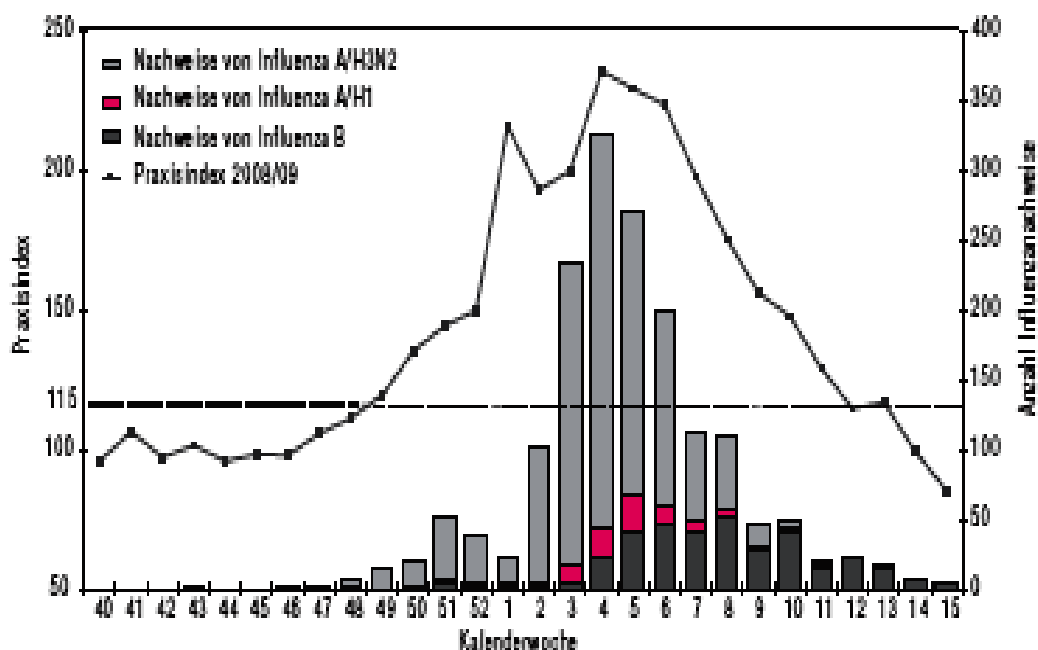
Die folgenden Daten stammen aus dem Saisonabschlussbericht der Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI). Der Beobachtungszeitraum lag zwischen der 40. Kalenderwoche (KW) 2008 bis zur 15. KW 2009 [AGI, 2009].

Begriffserläuterungen:

- Akute respiratorische Erkrankungen (ARE) = Pharyngitis, Bronchitis oder Pneumonie mit oder ohne Fieber
- Praxisindex = stellt die über alle Praxen gemittelte relative Abweichung der beobachteten ARE gegenüber einem für jede Praxis ermittelten „Normalniveau“ dar. Eine normale ARE- Aktivität (Hintergrund) wird beim Praxisindex bis zu 115 angenommen
- Konsultationsinzidenz = ist die berechnete wöchentliche Anzahl von ARE-Erstkonsultationen, die bei einem Arzt zur Vorstellung kommen, bezogen auf die Bevölkerung
- EISS- Index = Indikator für die „Stärke“ der Influenzasaison. Bezugspunkt ist ein gemittelter Wert der Höhepunkte „üblicher Influenzawellen“ Ein Wert von 80-120 entspricht dem, was im Höhepunkt einer üblichen Influenzawelle

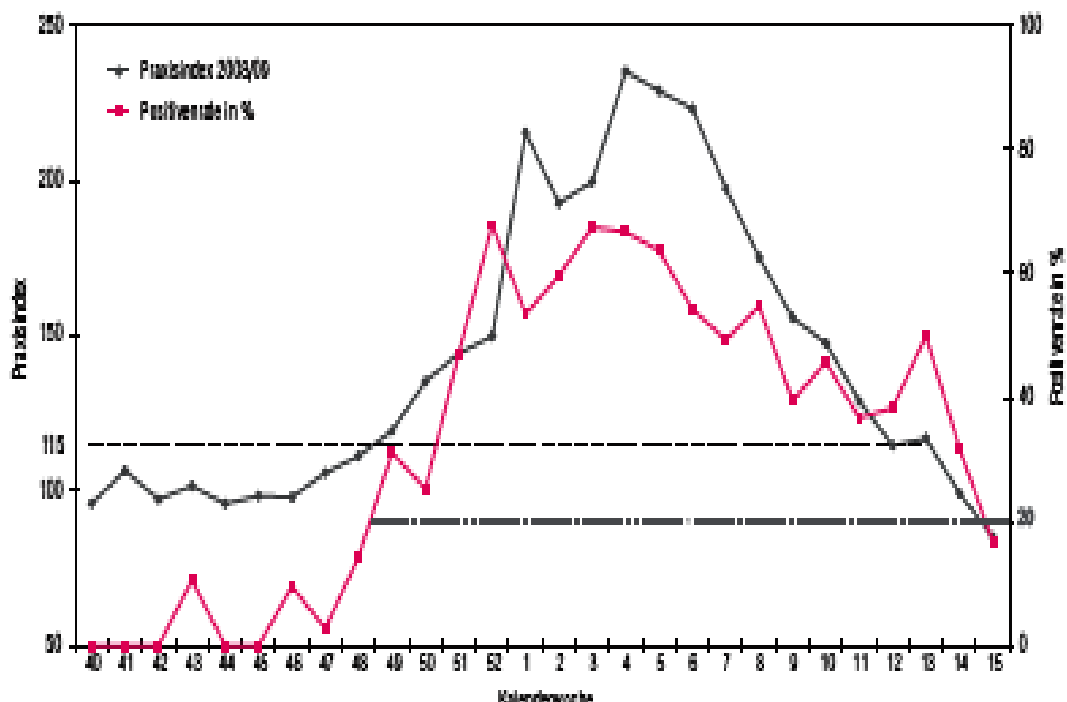
erwartet werden kann. Wöchentliche Werte von 0-40 werden als geringe, 40-80 als moderate, von 120-160 als heftige, und von >160 als außergewöhnlich heftige Aktivität interpretiert.

- Positivrate = Anteil der Proben, in denen Influenzaviren nachgewiesen wurden. Grundlage für die Ermittlung bilden alle von den AGI- Ärzten an das Nationale Referenzzentrum (NRZ) eingesandten Rachenabstriche.
- Influenza- Aktivität = Menge der akuten Atemwegsinfekte in der Bevölkerung, die über das erwartete Maß hinausgehen – bezieht sich also auf die so genannte Morbidität oder Erkrankungshäufigkeit



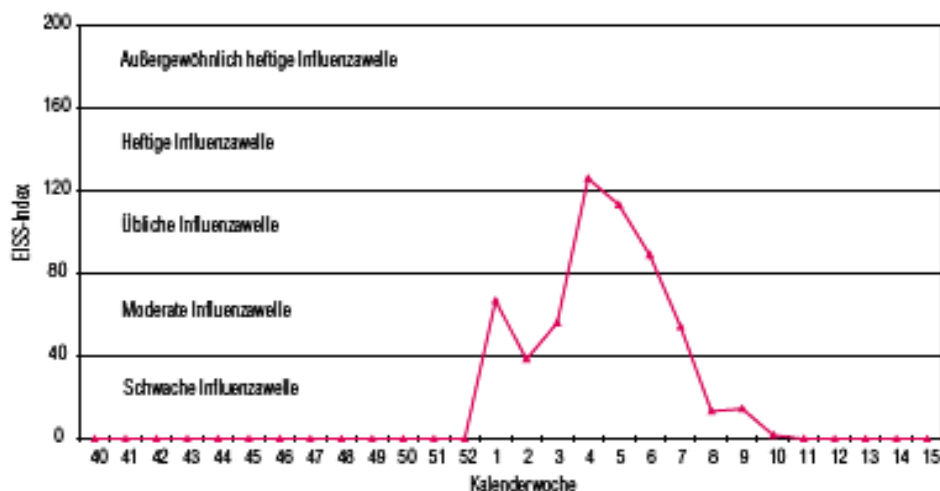
**Abb. 8: Praxisindex und Anzahl der Influenzanachweise in der Saison 2008/09**

Ein Praxisindex von 115 entspricht der Hintergrundaktivität. Die Skala des Praxisindex beginnt bei 50, um den Anstieg besser darstellen zu können.



**Abb. 9: Positivrate und Praxisindex in der Saison 2008/09**

Man erkennt in den beiden Abbildungen, dass ab der 43. KW sporadisch Influenza- Viren nachgewiesen wurden und ab der 49. KW auch der Praxisindex zum erstmals den Hintergrundwert übersteigt. Erst ab der 6. KW wurde dieser deutlich überschritten. Die Erkrankungszahlen nahmen ab der 50. KW in allen Altersgruppen rasch zu und erreichten ihren Höhepunkt zwischen der 3. und 5. KW. In diesem Zeitraum stieg auch die Positivrate auf nahezu 70 %.

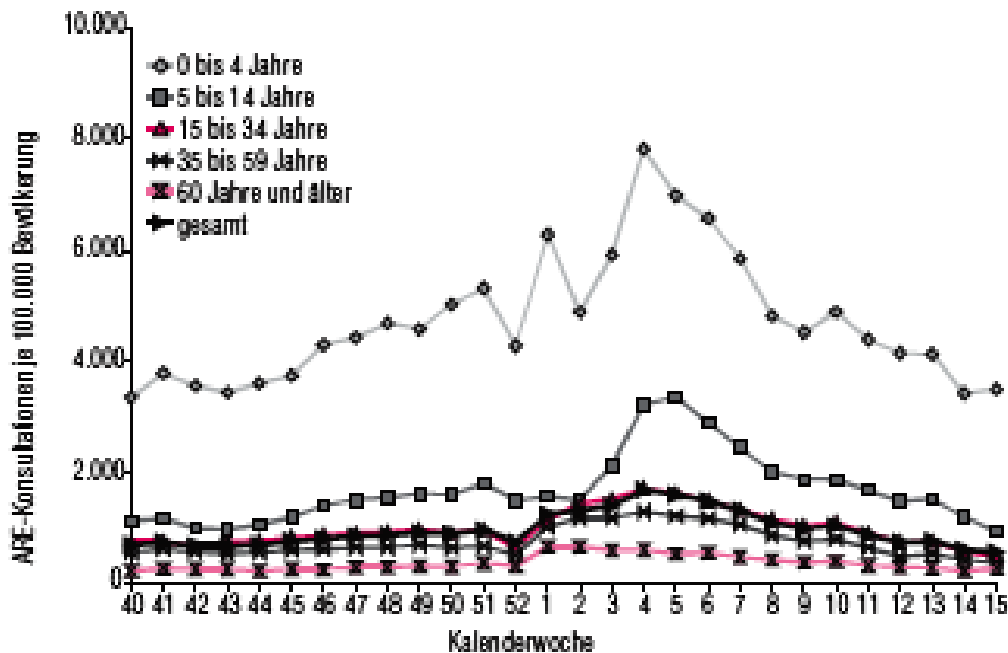


**Abb. 10: EISS- Index in der Saison 2008/09**

Auch im errechneten EISS- Index zeigte sich im Zeitraum zwischen der 3. und

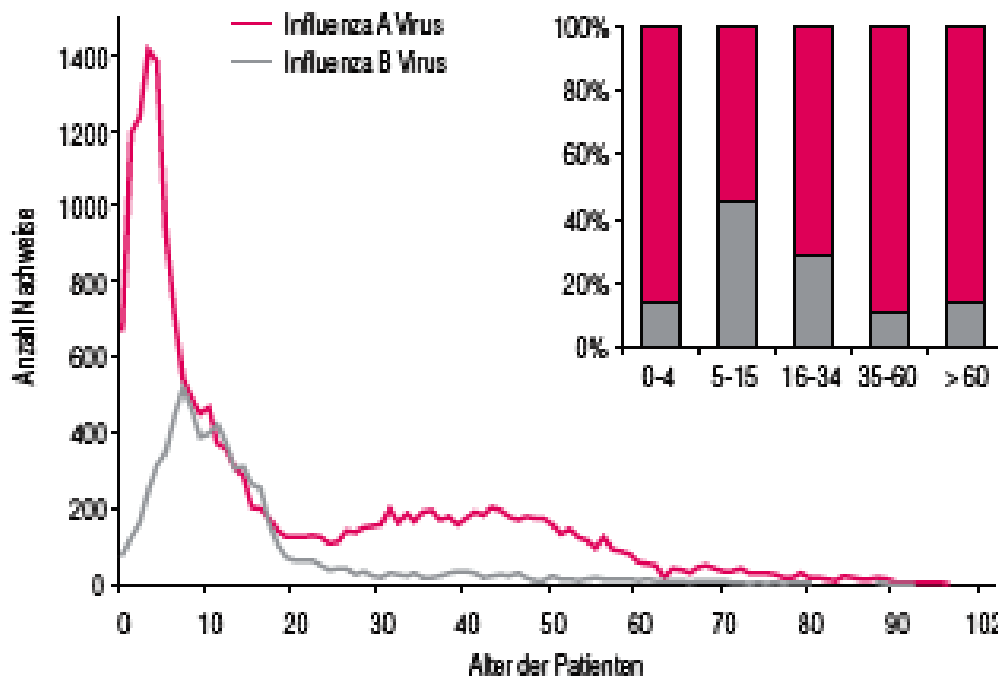
5. KW eine außergewöhnlich heftige Aktivität.

Ab der 7. und 8. KW ging die Influenza- Aktivität deutlich zurück und erreichte ab der 12. KW eine für diese Jahreszeit normales Niveau.



**Abb. 11: Konsultationsinzidenz in den einzelnen Altersgruppen während der Saison 2008/09**

In der Altersverteilung zeigt sich die typische Aufteilung mit einer hohen Hintergrundinzidenz an ARE bei den jüngeren Altersgruppen. Die Erkrankungswelle begann vermutlich bei den Klein- und Schulkindern, was sich an der früher einsetzenden Steigung des Graphen zeigt.



**Abb. 12:** Anzahl der ans RKI übermittelten Influenza- Nachweise nach Altersgruppen. Das Balkendiagramm zeigt den Anteil der Influenza A- und B-Meldungen pro Altersgruppe in Prozent.

In der Saison 2008/09 war die Gruppe der 5-15 Jährigen besonders stark betroffen. Aber auch die Erwachsenen waren verhältnismäßig stark an der Influenzawelle involviert.

Die Saison 2008/09 erreicht mit etwa 4,255 Millionen zusätzlichen ARE-Konsultationen das Niveau einer heftigen Influenzawelle, etwas oberhalb der mittelstarken Influenzawelle 2006/07. Im Vergleich hierzu waren die Saisons 2005/06 und 2004/05 mit 1,03 Millionen bzw. 1,445 Millionen zusätzlichen Konsultationen als schwach zu bezeichnen. Dagegen waren 2004/05 und 2002/03 mit 5,965 Millionen bzw. 4,835 Millionen zusätzlichen Konsultationen Jahre mit sehr heftigen Grippewellen.

Unter allen in der Saison 2008/09 in den Wochen 40/2008 bis 15/2009 aus dem Sentinel per PCR im NRZ nachgewiesenen Influenzaviren betrug der Anteil der Influenza A-Viren 79% (davon A/H3N2 92% und A/H1N1 8%) und der Anteil der Influenza B-Viren 21%.

Jahr	A(H3N2)	A(H1N1)	A(H2N1)	B
1988/89	19	76	0	4
1989/90	82	0	0	18

<b>Jahr</b>	<b>A(H3N2)</b>	<b>A(H1N1)</b>	<b>A(H2N1)</b>	<b>B</b>
1990/91	0	15	0	85
1991/92	69	31	0	0
1992/93	16	0	0	84
1993/94	100	0	0	0
1994/95	19	2	0	79
1995/96	55	42	0	3
1996/97	39	6	0	55
1997/98	96	7	0	1
1998/99	67	0	0	33
1999/00	98,8	1	0	0,2
2000/01	0,3	95,2	0	4,5
2001/02	46,6	0,1	0,3	53
2002/03	86,1	0	0	13,9
2003/04	99	0	0	1
2004/05	54	26	0	20
2005/06	20	10	0	70
2006/07	85	14	0	2
2007/08	1	51	0	48
2008/09	65	3	0	32

**Tab. 5: Verteilung der seit der Saison 1988/89 vom NRZ isolierten bzw. feintypisierten Viren auf die Influenza- Subtypen A(H3N2), A(H1N1), A(H2N1) und den -Typ B**

Der jeweils dominierende Influenzavirus- Typ bzw. -Subtyp ist rot markiert

In der Saison 2008/09 veranlassten die niedergelassenen Ärzte mehr als 18.000 zusätzliche Krankenhauseinweisungen aufgrund akuter Atemwegsinfekte. Zum Vergleich, im Winter 2007/08 wurden nur etwa 5.100 mit Influenza in Zusammenhang stehende Einweisungen getätigt und im Winter 2004/05 etwa 29.700.

### **1.12 Pandemie H1N1/2009, die sogenannte Schweinegrippe**

In den letzten Jahren traten immer wieder saisonale Grippewellen mit H1N1 auf. Ende Januar 2008 wurde von norwegischen Ärzten ein gegen Oseltamivir

resistenter Virusstamm (A/H1N1-H274Y) entdeckt, der mittlerweile weltweit verbreitet ist [WHO].

Mitte April 2009 wurde ein neuer H1N1 Subtyp gefunden, welcher nicht gegen Oseltamivir resistent war. Im weiteren Verlauf trat eine Häufung von Krankheitsfällen in Mexiko auf. Ende April bereits warnte die WHO vor einer weltweiten Verbreitung. Anfang Juni 2009 wurde die Warnung auf die höchste Alarmstufe erhöht, was einer Pandemie entspricht.

Die erste Veröffentlichung beschrieb die neue Variante als eine Neukombination aus zwei Viruslinien der Schweineinfluenza, einer nordamerikanischen und einer eurasischen. Die Zahl der Mutationen zwischen dieser Variante und den in der GenBank enthaltenen wahrscheinlichen Vorläufern ließ darauf schließen, dass die Gensegmente des neuen H1N1 seit längerem unentdeckt geblieben waren. Aufgrund der geringen genetischen Vielfalt unter den unterschiedlichen Virusisolaten der neuen Variante und die Tatsache, dass die bereits bekannten molekularen Marker für die Anpassung an Menschen nicht vorlagen, legte die Vermutung nahe, dass der Übergang des Virus auf den Menschen noch nicht lange zurück lag. Antigenetisch seien die Viren homogen und ähnelten dem nordamerikanischen porzinen A(H1N1)-Virus. Zu den saisonal auftretenden humanen A(H1N1)-Viren bestand ein Unterschied [Garten RJ. et al., 2009].

In einer Untersuchung zur Immunität der US-amerikanischen Bevölkerung zeigte sich, dass der saisonale Impfstoff keinen ausreichenden Schutz bot. Es wurde allerdings auch festgestellt, dass in den Seren in der Gruppe der über 60 Jährigen zu einem Drittel Antikörper gegen die neue Variante nachgewiesen werden konnte. Dies passte zu der Beobachtung, dass vorwiegend Jüngere an der neuen Form erkrankten. Erklärt wurden die vorhandenen Antikörper damit, dass es um die Mitte des vergangenen Jahrhunderts ein antigenetisch ähnliches humanes Virus gegeben haben muss [CDC, 2009].

Bis zum 30. August 2009 waren laut WHO mehr als 254200 laborbestätigte Infektionen mit dem H1N1 2009-Virus gemeldet worden, von denen mindestens 2837 tödlich verliefen.

Die laborbestätigten Fälle stellen allerdings nur einen Teil der tatsächlichen Infektionen dar, da in vielen Ländern der labormedizinische Nachweis nur bei besonders schweren Verläufen der Schweinegrippe durchgeführt wird. Die WHO selbst empfiehlt seit Juli 2009 nur noch die stichprobenartige Testung zur



Verfolgung des Verlaufs.

Inzwischen ist die Variante H1N1/2009 das weltweit dominierende Influenza-Virus. Ein Rückgang der Erkrankungszahlen wird aber bereits aus Südamerika, Teilen Australiens und Großbritannien gemeldet. In Südafrika kommt es aktuell noch zu einer Zunahme [CDC 2009/2].

In Deutschland sind laut Robert-Koch-Institut mit Stand 17.09.2009 insgesamt 19015 Fälle der Influenza H1N1/2009 übermittelt wurden. Als Fälle werden sowohl Personen mit einer Labordiagnose ausgewiesen als auch Erkrankte, bei denen selbst keine Labordiagnose durchgeführt wurde, die aber Kontakt zu anderen laborbestätigten Erkrankten hatten. Nachfolgende Tabelle gibt die Verteilung nach Bundesländern an. Autochthon werden dabei Infektionen genannt, die in Deutschland erworben wurden und nicht aus anderen Staaten eingeschleppt wurden.

Bundesland	gesamt	davon autochthon
Baden-Württemberg	2933	638
Bayern	2247	720
Berlin	543	156
Brandenburg	358	110
Bremen	154	70
Hamburg	417	111
Hessen	912	228
Mecklenburg-Vorpommern	146	31
Niedersachsen	2664	712
Nordrhein-Westfalen	5637	1656
Rheinland-Pfalz	1146	324
Saarland	253	51
Sachsen	347	130
Sachsen-Anhalt	344	101
Schleswig-Holstein	604	194

Thüringen	310	113
Summe	19015	5345

Tab. 6: Verteilung der gemeldeten Influenzafälle auf die einzelnen Bundesländer, Stand 17.09.2009

Das klinische Bild der Infektion scheint in allen Ländern weitgehend ähnlich zu sein. Ein überwiegender Teil der Patienten erkrankt nur leicht. Es gibt allerdings eine kleine Zahl von sehr schweren oder tödlichen Verläufen.

Wie bereits oben beschrieben wurde, ist der aktuell vorhandene Impfstoff nicht für die neue Variante von H1N1 geeignet. Daher wurde in den letzten Monaten fieberhaft an der Herstellung eines neuen Impfstoffes gearbeitet. Für eine vollständige Impfung sind 2 Dosen im Abstand von 2 Wochen bis maximal 6 Monaten notwendig. Ein Immunschutz stellt sich zwischen 1. und 2. Impfung ein und ist etwa 10 Tage nach der 2. Impfung komplett. Der in Deutschland von der Firma GlaxoSmithKline vertriebene Impfstoff mit dem Namen Pandemrix hat bereits eine Musterzulassung der Europäischen Kommission. Er ist bereits sowohl an Erwachsenen als auch an Kindern getestet wurden. Mit der Auslieferung und dem Beginn von Impfungen wird laut Paul-Ehrlich-Institut für Ende September oder Anfang Oktober gerechnet.

## 2 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung allgemeingültiger Influenza A Nachweisverfahren. Im ersten Teil sollten spezifische, immunogene prognostizierte Gen-Abschnitte aus dem Influenzavirus A-Genom kloniert werden. Sie wurden als Proteine in *E. coli* exprimiert, um sie danach auf immunkompetente Peptidabschnitte hin überprüfen zu können. Im zweiten Abschnitt der Arbeit soll einen molekularbiologischer Direktnachweis von Influenzavirus-RNA aus Speichelproben etabliert werden.

Das Influenza A-Virus besteht aus insgesamt 8 RNA-Segmenten. Diese kodieren für insgesamt 10 Proteine.

Aus der Primärsequenz der Influenza A Viren können zwei potentielle alternative offene Leserahmen (ORF) deduziert werden.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese ORF's für exprimierbare Proteine kodieren und ob diese Produkte zur Bildung von Antikörpern im infizierten Organismus führen. Hierfür müssen die ORF's zunächst amplifiziert und in Expressionsvektor kloniert werden. Nach Expression und Reinigung der Proteine sollte die Prävalenz von Antikörpern im humanen Seren, die gegen diese Protein gerichtet sind, getestet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Eignung von Saliva als Probematerial für eine Influenza spezifische RT-PCR evaluiert werden. Der Goldstandard ist für diese Untersuchung des Rachenabstrichs. Dieser kann jedoch unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. Non-Compliance des Patienten oder Säuglinge, nur schwer abgenommen werden. Daher sollte Saliva von Patienten, die sicher Influenza-positiv waren, mittels PCR auf Influenza untersucht werden.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamidstammlösung, Rotiphorese 30 (30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agarose NA ( <i>ultra pure</i> )	Pharmacia, Freiburg
$\epsilon$ -Aminocaprönsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat ( <i>p.a.</i> )	Merck, Darmstadt
Ampicillin, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Amylose-Harz	NEB, Frankfurt
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, München
ATP (Adenosin-5'-triphosphat), Na-Salz	Roche, Mannheim
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Biomax MR ( <i>Scientific Imaging Film</i> )	Kodak, Stuttgart
Börsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serumalbumin)-Standardlösung	Pierce, Rockfort, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CELLFECTIN Reagenz	Gibco BRL, Karlsruhe
Centriprep-3; Centricon-3; Microcon-3	Amicon, Millipore,
Konzentratoren	Bedford, USA
CHES (2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure)	Sigma, Steinheim
Coomassie-Brilliant Blau R-250 Tabletten	Merck, Darmstadt
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Rockfort, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dextranblau	Merck, Darmstadt
DMF (Dimethylformamid)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard III und VI	Roche, Mannheim

DTT (Dithiothreitol; 1,4-Dithiol-2,3-dihydroxybutan)	Roth, Karlsruhe
<b>EDTA</b> (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100% ( <i>Eisessig</i> )	Merck, Darmstadt
Ethanol, abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
<b>Filterpapier</b>	Schleicher & Schuell, Dassel
Formamid	Sigma, Steinheim
<b>Gentamycin</b>	Biochrom, Karlsruhe
L-Glutamin ( <i>200mM sterile Lösung</i> )	Gibco BRL, Karlsruhe
Glucose	Sigma, Steinheim
Glutathion (reduziert)	Pharmacia, Freiburg
Glutathion Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Grace's Insect Medium (2x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Guanidin HCl	Roth, Karlsruhe
<b>Harnstoff</b> ( <i>ultra pure</i> )	Gibco BRL, Karlsruhe
Hefeextrakt ( <i>granuliert</i> )	Merck, Darmstadt
HEPES ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)	Sigma, Steinheim
<b>IPTG</b> (1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
<b>Lysozym</b>	Boehringer, Mannheim
LiCl	Merck, Darmstadt
<b>Magnesiumchlorid-Hexahydrat</b>	Merck, Darmstadt
Maltose-Monohydrat ( <i>Grade I</i> )	Sigma, Steinheim
Manganchlorid	Sigma, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
MES (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat)	Sigma, Steinheim
Millex-GV Spritzenfilter ( <i>Durapore Membrane</i> )	Millipore, Bedford, USA

NAP-5, NAP-10, NAP-25 -Säulen ( <i>Sephadex G-25</i> )	Pharmacia, Freiburg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumformamid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Neutralrot	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
N-Octylglucosid ( <i>p.a.</i> )	Roche, Mannheim
PEG-8000 (Polyethylenglykol)	Sigma, Steinheim
Pepton ( <i>aus Kasein verdaut</i> )	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 800	Roth, Karlsruhe
PolyPrep Chromatography Columns	BioRad, München
Pyronin G	Serva, Heidelberg
Rainbow-Marker ( <i>RNP' 756, low MW range</i> )	Amersham, Braunschweig
Rainbow-Marker ( <i>RNP' 800, full MW range</i> )	Amersham, Braunschweig
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sea Plaque Agarose	BMA, Rockland, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Sofortbildfilm ( <i>Typ 667</i> )	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Streptavidin-biotinylated horseradish Peroxidase (POX)	Amersham, Braunschweig
<i>Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Pierce, Rockfort, USA
TC-100 Insect Medium	PAN Biotech, Aidenbach
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	BioRad, München
Terminationsmix ( <i>DNA-Sequencing Ready Reaction Kit</i> )	Perkin Elmer, Weiterstadt
Tetracyclin	Roche, Mannheim
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe

Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Serva, Heidelberg
<b>X-Gal</b> (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid)	Pierce, Rockfort, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

### 3.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ampli-Taq-DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	Roche, Mannheim
DNase I ( <i>aus Rinderpankreas</i> )	Roche, Mannheim
Exonuklease III Heidelberg	Stratagene GmbH,
Faktor Xa (1U/ $\mu$ l)	NEB, Frankfurt
Lysozym	Roche, Mannheim
PreScission Protease (2U/ $\mu$ l)	Pharmacia, Freiburg
Protease-Inhibitoren-Cocktail-Tabletten ( <i>Complete</i> )	Roche, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Ribonuklease A	Serva, Heidelberg
RNase ( <i>aus Rinderpankreas</i> )	Roche, Mannheim
SAP ( <i>shrimps alkaline phosphatase</i> )	Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Ligase (5U/ $\mu$ l)	Roche, Mannheim
T4-DNA-Polymerase (2-4U/ $\mu$ l)	Roche, Mannheim
T4 5'-Polynukleotidkinase (10U/ $\mu$ l)	Roche, Mannheim
Thermus thermophilus- Polymerase Mix	Clonetec, Heidelberg

Restriktionsendonukleasen	Spaltstelle	Herkunft
BamHI (10U/ $\mu$ l)	5' G↓GATCC 3'	Roche, Mannheim
EcoRI (10U/ $\mu$ l)	5' G↓AATTC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
HindIII (10U/ $\mu$ l)	5' A↓AGCTT 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NdeI (10U/ $\mu$ l)	5' CA↓TATG 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

NheI (10U/μl)	5' G↓CTAGC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NotI (10U/μl)	5' GC↓GGCCGC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sall (10U/μl)	5' G↓TCGAC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
XhoI (10U/μl)	5' C↓TCGAG 3'	Roche, Mannheim
SacI (10U/μl)	5' G↓AGCTC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Die Restriktionsendonukleasen wurden in 10-fach konzentrierten Inkubationspuffern nach Herstellerangaben der Firmen Roche, Mannheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot eingesetzt.

### 3.3 Antikörper

Peroxidase- konjugiertes Anti- Maus IgG vom Kaninchen	DAKO, Hamburg
--	---------------

Peroxidase- konjugiertes Anti- Kaninchen IgG vom Schwein	DAKO, Hamburg
---	---------------

#### 3.3.1 Monoklonale Antikörper

Anti- His- tag- IgG von der Maus	Qiagen, Hilden
----------------------------------	----------------

### 3.4 Vektoren und Matrizen

#### 3.4.1 Vektor pGEX-6P-1

pGEX-6P-1	Pharmacia, Freiburg
-----------	---------------------

Vektor zur bakteriellen Expression von GST-Fusionsproteinen.



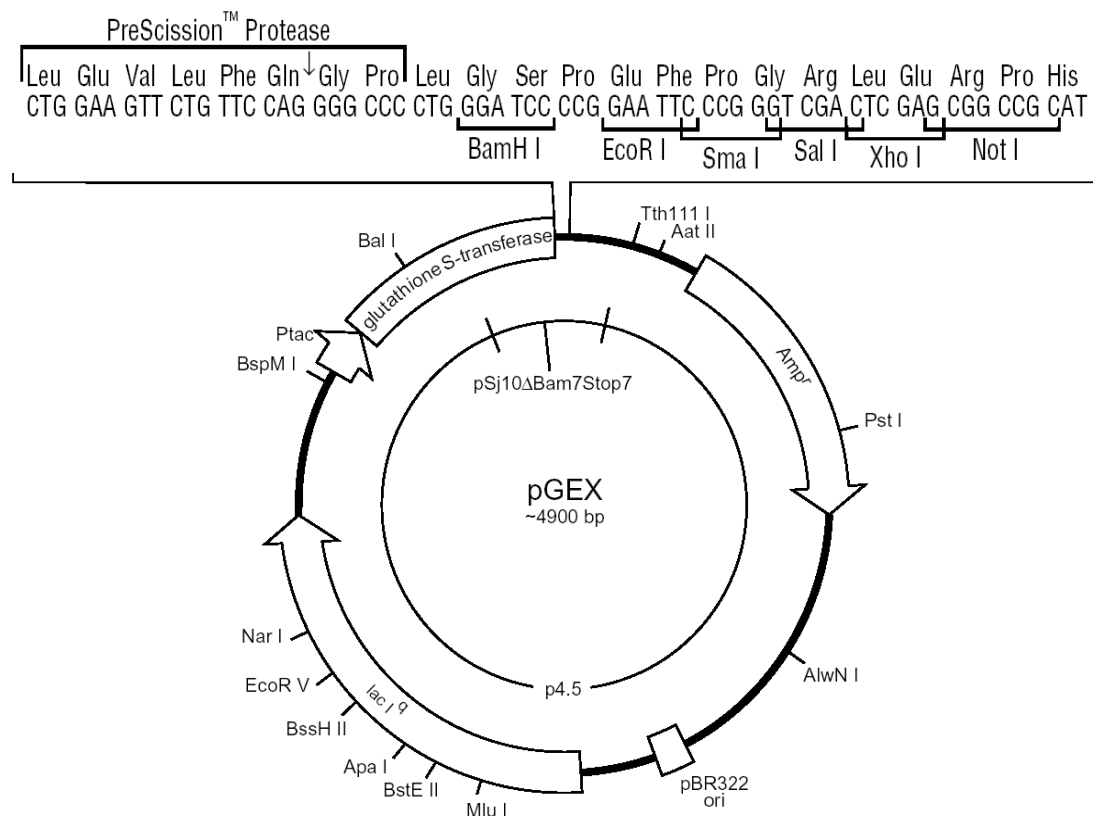


Abb. 13: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pGEX-6P-1

### 3.4.2 Vektor pQE 30

pQE 30

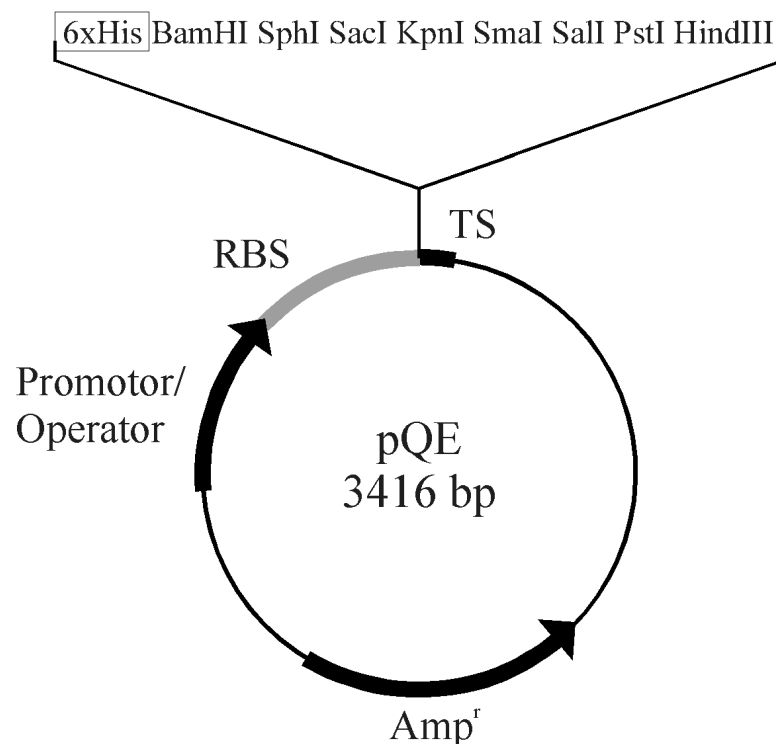
Qiagen, Hilden

Der autonom replizierende prokaryontische Expressionsvektor pQE 30 gehört der pDs Vektorfamilie [Bujard et al., 1987] an und leitet sich von den Plasmiden pDS56/RBSII und pDS781/RBSII-DHFRS [Stüber et al., 1990] ab.

Der pQE 30- Vektor wird zur Transformation und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* eingesetzt. Transformierte *E. coli* Zellen können aufgrund eines  $\beta$ - Laktamase Gens, welches im Vektor enthalten ist und die Ausbildung der Ampicillin- Resistenz bedingt, selektioniert werden.

Der 3462 bp große Vektor, in den über die Polylinker- Region bis zu 5 kbp Fremd- DNA kloniert werden können, besitzt eine regulierbare Promotor- Operator Einheit mit einem Phagen T5- Promotor und zwei lac- Operator Sequenzen, die eine effiziente Repression des T5- Promotors erlauben. Die Expression wird durch das doppelte lac- Operator- System kontrolliert und kann

durch Zugabe von IPTG induziert werden.



**Abb. 14: Schematische Darstellung des prokaryontischen Expressionsvektors pQE**

In der Abbildung ist die IPTG induzierbare Promotor-Operator Einheit, die Ribosomenbindungstelle (RBS), die Polylinkerregion, die Transkriptions-Terminationssignale (TS) und das Beta-Laktamase-Gen ( $Amp^r$ ) des pQE-Vektors dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Polylinkerregion im Detail. Im N-terminalen Teil sind die RBS, der 6xHis-tag und die Bindungsstelle des monoklonalen Anti-His-Antikörpers eingezeichnet

Mit Hilfe eines 6x His-tag Anteils, der als Fusionsanteil des Fremdproteins fungiert, kann durch eine selektive Chelat-Bindung am Ni-NTA-Trägermaterial eine Trennung des rekombinanten Proteins von bakteriellen Proteinen erzielt werden. Ferner besteht die Möglichkeit die stabile Expression des rekombinanten Proteins über His-tag spezifische Antikörper nachzuweisen.

Zur Transformation und Amplifikation der hergestellten pQE-Konstrukte wurden M15 [pREP 4] E. coli Zellen verwendet, die ein 3740 bp großes Plasmid [pREP 4] tragen, das für die Kanamycin-Resistenz und den lac-Repressor kodiert. Durch dieses „high-copy“ Plasmid ist eine hohe Konzentration des lac-Repressors gewährleistet und damit verbunden die Kontrolle der Expressionsrate des Fremdproteins möglich.

### 3.5 Bakterienstämme

E. coli	Genotyp	Firma
BL-21	F <sup>-</sup> , ompT, r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup>	Pharmacia, Freiburg
DH5α	supE44, ΔlacU169(φ80lacZΔM15), hsdR 17, recA1, endA1, gyrA96, thi <sup>-</sup> 1, relA 1	Gibco BRL, Karlsruhe
M15	Nal <sup>s</sup> Str <sup>s</sup> rif <sup>s</sup> , lach <sup>-</sup> ara <sup>-</sup> gal <sup>-</sup> mtl <sup>-</sup> F <sup>-</sup> recA <sup>+</sup> uvr <sup>+</sup>	Qiagen, Hilden

Tab. 7: Verwendete E. coli Stämme

### 3.6 Kits

ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System	Gibco BRL, Karlsruhe
Bulk GST Purification Module	Pharmacia, Freiburg
Chemoluminiszenz Kit ( <i>super signal</i> )	Pierce, Rockfort, USA
Crystal Screen I, II Macromolecular Crystallization Reagent Kit	Hampton Research, Laguna Hills, CA, USA
GeneAmp PCR Core Reagent Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
QIAquick PCR-Reinigungs Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktions Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep 8 Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
SilverQuest Silver Staining Kit	Invitrogen, CH Groningen, Niederlande
TA Cloning Kit	Invitrogen, CH Groningen, Niederlande

### 3.7 Nährmedien und Puffer für Bakterien- und Zellkultur

LB-Medium:	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
<i>low salt</i> LB-Medium mit Glucose:	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 0,2 % Glucose ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
LB-Agar:	15 g Bactoagar ad 1000 ml LB-Medium
<i>Ggf. zur Blau-Weiß-Selektion</i>	<i>100 µg/ml X-Gal</i> <i>40 µg/ml IPTG</i>
LB-Bacmid Agar:	12 g Bactoagar 50 µg/ml Kanamycin 7 µg/ml Gentamycin 10 µg/ml Tetracyclin 100 µg/ml X-Gal 40 µg/ml IPTG ad 1000 ml LB-Medium
SOC-Medium:	20 g Pepton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Glucose ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O

Die Medien wurden autoklaviert (*15 min, 121°C, 1 bar*). Antibiotika bzw. steril filtrierte Glucose wurden gegebenenfalls nach Abkühlen auf 50°C zugesetzt. Die Konzentration für Ampicillin beträgt 100 µg/ml.

PBS-Puffer:	8,00 g NaCl
	0,20 g KCl
	1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,20 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O

TSS-Puffer:	85 % (v/v) LB-Medium
	10 % (w/v) PEG 8000
	5 % (v/v) DMSO
	50 mM MgCl <sub>2</sub>

Der Puffer wurde auf pH 6,5 eingestellt und sterilfiltriert (*bei 4°C ca. 4 Wochen haltbar*).

Plaque-Agar A:	50 % (v/v) Grace's Insect Medium (2x) mit 20 % FCS
	50 % (v/v) 2,5 % Sea Plaque Agarose in PBS

Plaque-Agar B:	50 % (v/v) 0,02 % Neutralrot in dH <sub>2</sub> O
	50 % (v/v) 2,5 % Sea Plaque Agarose in PBS

Die Komponenten des Plaque-Agars A bzw. B wurden jeweils bei 42°C gemischt.

### 3.8 Puffer für Elektrophorese und Elektroblotting

10x TBE-Puffer, pH 8,0:	108 g Tris
	55 g Borsäure

---

	40 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
TE-Puffer, pH 8,0:	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
6x Probenpuffer für Agarosegele: Xylencyanol	0,23 % Bromphenolblau bzw.  40 % Saccharose in TE-Puffer
Ethidiumbromidlösung zum Anfärben von Agarosegelen:	0,006 % Ethidiumbromid in 0,5x TBE-Puffer
Probenpuffer für Sequenziergele:	25 mM EDTA, pH 8,0 50 mg/ml Dextranblau  ----- 1 : 5 mit deionisiertem Formamid versetzen
6x Probenpuffer für Proteingele:	380 mM Tris-HCl, pH 6,8 10,28 % (w/v) SDS 36,0 % Glycerin 5,0 % β-Mercaptoethanol 0,012 % (w/v) Bromphenolblau
10x Laufpuffer für Proteingele:	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
Coomassie Färbelösung für Proteingele:	16 Coomassie-Brilliant Blau R-250 Tabletten 400 ml Ethanol

---

Anodenpuffer I:	100 ml Eisessig ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O 100 ml 1 M Tris-HCl, pH 9,0 200 ml Ethanol ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
Anodenpuffer II:	25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 200 ml Ethanol ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
Kathodenpuffer:	25 ml 1 M Tris-HCl, pH 9,0 5,25 g ε-Aminocaprinsäure 200 ml Ethanol ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O

### 3.9 Puffer für Proteinexpression, Reinigung und Enzymaktivitätstest

MOPS-Puffer, 10x:	200 mM 3 ( N-Morpholino )- Propansulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA mit 10M NaOH auf pH 7.0 einstellen, lichtgeschützt
PreScission Protease- Spaltpuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT
Enzymaktivitätstest-Puffer:	100 mM HEPES, pH 7,0 2 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 % Triton X-100

1 mM Mercaptoethanol

### 3.10 Geräte und Systeme

ABI PRISM 377 DNA	Sequencer Perkin Elmer, Weiterstadt
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge A	Heraeus, Hanau
GeneAmp PCR	System 2400 Perkin Elmer, Weiterstadt
LS-5B Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt
ÄKTA-FPLC Chromatographie-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DU-40 Spectrophotometer	Beckman/Coulter, Unterschleißheim
Ultraschallgerät Sonifer B15	Branson, Dambury, CT, USA
Minifuge T	Heraeus, Hanau

### 3.11 Chromatographiesäulen

Hi-Trap Chelating	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
-------------------	---

### 3.12 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma, Steinheim bezogen. Sie wurden für Sequenzierreaktionen und die Polymerase- Kettenreaktion eingesetzt.



Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
pQE30N1' SACLhin	GCGAGCTCGTGAATGGCAACTCAGCACCGTCTG
pQE30N1' HindIIIrück	CGCAAGCTTTTACATCTGCAGTGGGGTTTTTGGT
pGex-6P-1N1' EcoRIhin	GCGAATTCATGGCTGACTATCTGGTTTCAAA TTG
pGex-6P-1N1' XhoIrück	CGCTCGAGACATTTGACCTAATTCGAACGTTTCA
pGex-6P-1NP' XhoIhin	GCCTCGAGATGTTGTAACCCGTTTAAGACTAGGT
pGex-6P-1NP' BamHIIrück	TGGGATCCTTAATGGCCATCCGGAATCCAGGTT

Tab. 8: Verwendete Oligonukleotide Restriktions-Enzym-Schnittstellen sind unterstrichen

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

Für sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurde als DNA-Matrize eine Subklonierung aus dem Gensegment des Influenza A-Virus, welches für die Neuraminidase (N1') bzw. für die Nukleoproteine (NP') kodiert, verwendet.

#### **4.1.1 Amplifikation der gewünschten DNA-Segmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich bei bekannter Sequenz der Matrizen-DNA unter Verwendung sequenzkomplementärer Oligonukleotide (Primer) ein DNA-Fragment definierter Sequenz und Länge zu amplifizieren [Mullis & Faloona, 1987].

##### **4.1.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion läuft in Zyklen mit drei sequentiellen Phasen ab:

1. die Denaturierung der Doppelstrang-DNA (Matrize)
2. die Hybridisierung der Starteroligonukleotide (annealing)
3. die Reduplikation der Einzelstränge durch eine temperaturstabile DNA-Polymerase

Es wurde das Advantage <sup>TM</sup> Genomic PCR Kit (Clontech, Heidelberg) eingesetzt. Der Vorteil dieses Kits liegt in der Verwendung zweier DNA-Polymerasen. Einmal eine thermostabile *Tth*-Polymerase aus *Thermus thermophilus*, die eine hohe Polymerisationsgeschwindigkeit ermöglicht, sowie eine 3'-5' „Proofreading“-Aktivität aufweist. Durch die Kombination dieser beiden Enzym-Aktivitäten ist es möglich, relativ große Sequenzabschnitte mit sehr geringer Fehlerquote aus dem Genom zu amplifizieren. Für die PCR

wurden ca. 2 - 50 ng Matrizen-DNA in 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Inkubiert wurde in 0.2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400).

Die Reaktion wurde mit einer 1 Minute langen Phase bei 94°C begonnen, um die vollständige Denaturierung der Matrizen-DNA zu gewährleisten. Der Amplifikationszyklus umfasste die Denaturierung mit 30 Sekunden Dauer bei 94°C, dem Hybridisierungsschritt von 30 Sekunden Dauer bei einer Temperatur von 55°C sowie der Polymerisation über 3 Minuten bei einer Temperatur von 68°C. Dieser Zyklus wurde insgesamt 30 Mal wiederholt.

Phase	Vorgang	Temperatur (°C)	Dauer (s)
1.	Denaturierung	94	30
2.	Hybridisierung	55	30
3.	Polymerisation	68	180

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 3 Minuten auf 68°C erwärmt und abschließend auf 15°C gekühlt. Die Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz wurde in einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

### Reaktionsgemisch

<i>Aqua bidest.</i>	33,8 µl
Reaktionspuffer (10-fach)	5,0 µl
(MgO) <sub>2</sub> Ac (25 mM)	2,2 µl
Nukleotidgemisch (50-fach)	1,0 µl
Primer 1 (20 – 50 pmol)	1,0 µl
Primer 2 (20 – 50 pmol)	1,0 µl
Advantage <i>Tth</i> -Polymerase Mix (50-fach)	1,0 µl

### Reaktionspuffer, pH 9,3 (10-fach)

Tris/HCl	400 mM
KOAc	150 mM

### Nukleotidgemisch (50-fach)

DATP	10 mM
------	-------

---

DGTP	10 mM
DCTP	10 mM
DTTP	10 mM

**Advantage *Tth*-Polymerase Mix, pH 7,5 (50-fach)**

<i>Tth</i> -Polymerase Mix	6,0 Units
<i>Tth</i> -Start Antikörper	0,5 µg/µl
Glycerin	50,0 % (v/v)
Tris/HCl	10,0 mM
KCl	230,0 mM
EDTA	75,0 µM
Dithiothreitol	750,0 µM
BSA	365,0 µg/ml

**4.1.2 Reinigung der PCR-Amplifikate**

Für die Reinigung der PCR-Produkte wurde das „QIAquick Purification Kit“ der Firma Qiagen, Hilden eingesetzt. Der Einsatz der mitgelieferten Puffer und Materialien wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zusammensetzung der mitgelieferten Puffer wurde vom Hersteller nicht näher spezifiziert. Für die Präparation wurde der Reaktionsansatz der PCR nach erfolgter Amplifikation mit 5 VT Puffer PB gemischt und auf eine Silicamembran-Säule gegeben. Durch die Zentrifugation über 1 min bei 13.000 rpm wurde die DNA an die Silicamembran gebunden. Der Durchfluß wurde verworfen und die gebundene DNA wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl *aqua bidest*. Die so von Salzen, Enzymen und Nukleotiden gereinigte DNA wurde für die Klonierung in bakteriellen Vektoren verwendet.

**4.2 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

#### **4.2.1 Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde der „QIAprep Spin Plasmid Kit“ bzw. der „QIAprep 8 Miniprep Kit“ verwendet. Diese Kits basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit nachfolgender DNA-Adsorption an einer Silicamembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Für die Präparation der Plasmide wurden 5 ml LB-Medium mit einer das Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Übernacht-Kultur wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 5 min bei 13.000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Bakteriensediment in 250 µl Puffer P1/RNase (0,1 mg/ml) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurden die Zellen lysiert und die DNA denaturiert. Um eine Renaturierung der DNA zu erreichen, wurden weitere 350 µl bzw. 500 µl Puffer N3 zugesetzt. Dieser Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine Silica-Gel Membran gegeben und für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die nun gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die Elution wurde mit 50 µl *aqua bidest* durchgeführt. Die Lagerung erfolgt bei – 20°C.

#### **4.2.2 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA**

Für die Präparation von 300 µg bis zu 500 µg Plasmid-DNA wurde das „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden 100 ml einer üN Bakterienkultur 15 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Bakteriensediment in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Dazu wurden 10 ml Puffer P2 hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 dazu gegeben, der gesamte Ansatz in eine QIAfilter-Kartusche überführt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde unter Druck durch den Filter gepresst und so von unlöslichen Bestandteilen, wie bakterielle Proteine, chromosomale DNA etc. befreit. Das klare Lysat wurde auf eine zuvor mit Puffer QBT äquilibrierte Silica-Gel Membran Säule gegeben. Die nun an der Membran

gebundene Plasmid-DNA wurde anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Die Fällung der DNA erfolgte durch die Zugabe von 0,7 VT Isopropanol und einer 30 minütigen Zentrifugation bei 15.000 rpm (Rotor: SW 28) und 4°C. Das so erhaltene DNA-Präzipitat wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die luftgetrocknete DNA wurde in *aqua bidest* aufgenommen und bei –20°C gelagert.

**Puffer P1, pH 8,0**

Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
Rnase A	100 µg/ml

**Puffer P2**

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

**Puffer P3, pH 5,5**

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

**Puffer QBT, pH 7,0**

NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)
Triton X-100	0,15 % (w/v)

**Puffer QC, pH 7,0**

NaCl	1 M
MOPS	50 mM
Isopropanol	15 % (v/v)

**Puffer QF, pH 8,5**

NaCl	1,25 M
Tris/HCl	50 mM

Isopropanol

15 % (v/v)

Die Zusammensetzung der Puffer N3 und PE wurden von der Firma Qiagen, Hilden nicht näher erläutert.

#### **4.2.3 Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen**

Die Konzentration von einzelsträngiger bzw. doppelsträngiger DNA wurde durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Gene Quant II-Spektrophotometer (Pharmacia, Freiburg) ermittelt. Dabei wurde zur Berechnung der Konzentration im linearen Extinktionsbereich ( $E = 0,1-0,8$ ) für  $E_{260nm} = 1,00$  eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngige DNA und für einzelsträngige DNA 20 µg/ml bei einer Schichtdicke von  $d = 10$  mm zugrunde gelegt [Sambrook et al., 1989]. Um die Messung im linearen Extinktionsbereich durchzuführen wurden die Proben mit *aqua bidest* entsprechend verdünnt.

#### **4.3 Restriktion von DNA**

Zur Kontrolle und Analyse von Plasmiden sowie zur Einbringung von Fremd-DNA in Vektoren wurden die entsprechenden Vektoren und PCR-Amplifikate mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut. Für einen vollständigen Verdau von 0,1 µg – 0,5 µg doppelsträngiger DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl, welchem 2 – 4 Einheiten Restriktionsenzym sowie 1 µl 10-fach konzentrierter Inkubationspuffer zugesetzt waren, 90 Minuten bei einer für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Für den Verdau größerer Mengen DNA wurden entsprechend größere Volumina eingesetzt. Wurde mit mehr als einem Restriktionsenzym geschnitten, so wurde erst mit einer Restriktionsendonuklease verdaut und anschließend die DNA gefällt. Zur Fällung von größeren DNA-Molekülen wurden der Reaktionslösung 0,4 VT 4 M LiCl Lösung sowie 1 VT Isopropanol zugesetzt und danach 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in *aqua bidest* aufgenommen und mit einer weiteren Restriktionsendonuklease

verdaut. Bei kleineren DNA-Molekülen, wie zum Beispiel PCR-Amplifikate, welche mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten werden mussten, wurden nach dem ersten Verdau gefällt, jedoch anschließend eine Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt. Nach Verdau mit der ersten Endonuklease wurden dem Ansatz 0,5 VT 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung sowie 2,5 VT Ethanol zugesetzt und über 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde anschließend 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in *aqua bideest* aufgenommen.

#### **4.3.1 Phenolextraktion und Ethanol-fällung von DNA**

Für die Reinigung wässriger DNA-Protein-Lösungen wurde eine modifizierte Phenolextraktions-Methode verwendet. Dazu wurde die DNA-Protein-Lösung mit 0,5 VT Phenol und 0,5 VT Chloroform gemischt. Um eine Phasentrennung zu erreichen, wurde dieses Gemisch 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde anschließend abgenommen und nochmals mit 1 VT Chloroform gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Volumen der oberen wässrigen Phase ermittelt und anschließend mit 0,1 VT 5 M NaCl und 2 VT Ethanol gemischt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht gefällt. Nach erfolgter Fällung wurde 20 Minuten bei 13.000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend abgenommen und das DNA-Sediment mit 100  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die gereinigte und getrocknete DNA wurde in *aqua bideest* aufgenommen.

#### **4.4 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA wird durch ihre überwiegend negative Ladung ermöglicht, so dass die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe mit jeweils unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit in Richtung Anode wandern. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Überprüfung der Restriktion



von Plasmiden, sowie zur Identifikation von PCR-Amplifikaten und deren präparativen Gewinnung verwendet. Abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1- 2 %ige Agarosegele verwendet. Es wurde eine Bio-Rad-Minigel-Kammer gefüllt mit 1x TAE-Laufpuffer verwendet. Die zu trennende DNA-Lösung wurde mit 6-fach Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 6 V/cm. Um eine visuelle Darstellung der aufgetrennten DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid, als interkalierendes Agens in einer Konzentration von 0,15 µg/ml zugesetzt und das Trenngel unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm ausgewertet. Um die Größe der erhaltenen Fragmente abschätzen zu können, wurde ein DNA-Längenstandard (Boehringer, Mannheim) als Marker mit aufgetrennt. Das so erhaltene Bandenmuster wurde fotografisch dokumentiert. Für die präparative Agarosegelelektrophorese wurde Low-Melting-Point Agarose verwendet. Dazu wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Für die Elution der DNA wurde das „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet.

**TAE Puffer (50-fach)**

Tris-hydroxymethyl-aminomethan	2 M
Eisessig	57,1 % (v/v)
EDTA	50 mM
aqua bidest.	

**Lade-Puffer (6-fach)**

Glycerin	30 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

Xylencyanol 0,25 % (w/v)

*aqua bidest*

#### 4.4.1 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Bei diesem Verfahren werden zur DNA-Bindung Silicamembranen verwendet, an welche die DNA in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen bindet. Es ermöglicht die Präparation von DNA-Fragmenten einer Größe von 100 bp bis zu 10 kbp. Die Präparation der DNA aus den Gelen wurde unter Verwendung der mitgelieferten Puffer gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu je 100 mg des ausgeschnittenen Gels wurden 300 µl Puffer QX1 hinzugegeben und für 10 Minuten bei 50°C unter mehrmaligem Invertieren, bis die Agarose geschmolzen war, inkubiert. Anschließend wurde diesem Ansatz je ein Gelvolumen Isopropanol zugesetzt, durchmischt und auf eine Silicamembran-Säule gegeben. Die beladene Säule wurde für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die an der Silicamembran gebundene DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die DNA wurde anschließend mit 50 µl *aqua bidest* eluiert.

#### Puffer QX1, pH 7,0

NaI	3 M
NaClO <sub>4</sub>	4 M
Tris/HCl	10 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	10 mM

Die Zusammensetzung des Puffers PE wurde von der Herstellerfirma (Qiagen, Hilden) nicht näher spezifiziert.

## 4.5 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in den entsprechenden Vektor wurde das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet. Um die Ligation von aufgereinigten PCR-Amplifikaten mit dem Plasmid zu ermöglichen, war es notwendig Amplifikat und Vektor mit den jeweils gleichen Restriktionsenzymen zu verdauen. Für die Ligationsreaktion wurde der vorverdaute Vektor und das Insert im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 in Abhängigkeit von der Größe des Inserts eingesetzt. Dem Reaktionsansatz wurden etwa 10 ng verdaute Plasmid-DNA, die entsprechende Menge Insert, 1 µl Ligasepuffer (10-fach) sowie eine Einheit T4-DNA-Ligase (NEB, Schwalbach) zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Der Ansatz wurde üN bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde für die Transformation von *E.coli* verwendet.

### T4 DNA Ligase Puffer, pH 7,8 (10-fach)

Tris/HCl	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
ATP	10 mM
BSA	250 µg/ml
Dithioerythrit	100 mM

## 4.6 Transformation von *E. coli*

### 4.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurden 100 ml LB Medium mit einem Milliliter einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur angeimpft. Der Ansatz wurde anschließend auf einem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5, d.h. einer Zellzahl von ca.  $4 \times 10^7$  bis  $7 \times 10^7$  Zellen/ml, inkubiert. Nachdem die gewünschte Zellzahl erreicht war, wurde der Ansatz für 20 Minuten auf Eis

inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 2750 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakteriensediment in 10 ml TSS-Puffer resuspendiert. Die in TSS-Puffer resuspendierten *E. coli* Zellen wurden anschließend noch einmal für 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie für die Transformation verwendet wurden.

LB-Medium	Siehe 3.7
-----------	-----------

#### **TSS-Puffer, pH 6,5**

LB-Medium	85 % (w/v)
Polyethylenglykol 800	10 % (w/v)
DMSO	5 % (w/v)
MgCl <sub>2</sub>	50 mM

Der TSS-Puffer wurde vor der Verwendung steril filtriert.

#### **4.6.2 Transformation**

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli* Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 0,001 bis 0,5 pmol Vektor-DNA vermischt. Zur Bindung der Plasmid-DNA an die Bakterienzellen wurde der gesamte Ansatz für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt, um die Aufnahme der DNA die Zelle zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 800 µl LB-Medium versetzt. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurde der Transformationsansatz für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Um plasmidtragende Klone zu selektionieren, wurden 100 µl und 900 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C üN inkubiert.

LB-Medium Siehe 3.7

### **LB-Agar<sup>Amp,Kan</sup>**

LB-Medium

Bacto-Agar 15,0 g/l

Ampicillin 0,1 g/l

Kanamycin 0,025 g/l

## **4.7 Sequenzierung**

Zur Überprüfung der Klonierungen bzw. Subklonierungen wurde die DNA-Sequenzierung verwendet. Es wurde eine modifizierte Form der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode [Sanger et al., 1977] für die Sequenzierung doppelsträngiger DNA verwendet. Die Sequenzierungen wurden im ABI PRISMA 377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, USA) mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide durchgeführt.

### **4.7.1 Sequenzierreaktion**

Es wurden für die Sequenzierreaktion Matrizen-DNA in Konzentrationen von 0,4 µg/µl und 1,5 µg/µl eingesetzt. Zur Matrizen-DNA wurden 10 pmol gereinigte Oligonukleotide und 8 µl Terminator Ready Reaction Mix hinzugegeben. Dieser enthielt 4 Einheiten AmpliTaq DNA Polymerase FS, die Nukleotide dATP, dTTP, dCTP und dGTP sowie die entsprechenden fluoreszenzmarkierten ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP. Der Reaktionsansatz wurde mit *aqua bideest* auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz in einem GeneAmp PCR System 2400-Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) inkubiert. Wie bei der Polymerasekettenreaktion erfolgte die Inkubation in 3 Schritten, 1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA, 2. Hybridisierung der Starter- Oligonukleotide und 3. Polymerisation.

	Temperatur (°C)	Dauer (Sekunden)
Denaturierung	96	30
Hybridisierung	52	30
Polymerisation	60	240

Dieser Zyklus wurde insgesamt 25 mal wiederholt.

Anschließend wurden dem Ansatz zur Fällung der DNA 0,1 VT 3M NaAc (pH 4,6) sowie 2,5 VT Ethanol zugegeben und bei 13.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Sediment mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 8 µl Ladepuffer aufgenommen und bei –20°C gelagert. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurde die DNA für 3 Minuten auf 94°C erhitzt, wodurch eine Denaturierung der DNA sichergestellt wurde.

#### **Ladepuffer**

Formamid	80 % (w/v)
Dextran-Blau	1 % (w/v)
EDTA	5 mM

#### **4.7.2 Sequenziergel und Elektrophorese**

Für die Herstellung des Sequenziergels wurden fluoreszenzfreie, 36 cm lange Glasplatten verwendet. Vor der Herstellung des Sequenziergels wurden die Glasplatten mit einer 10 %igen (v/v) wässrigen Isopropanol-Lösung und Alconox gründlich gereinigt. Die Platten wurden mit 0,2 mm dicken Abstandshaltern (Spacer) montiert. Zur Herstellung des Sequenzier-Gels wurde eine 5 %ige Polyacrylamid-Harnstofflösung nach Zugabe von 350 µl 10 %iger (w/v) wässriger APS-Lösung und 5 µl TEMED zwischen die beiden Glasplatten gegeben.

Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in den Sequenzierautomaten (ABI PRISMA 377 DNA Sequencer) eingebaut. Vor dem Auftragen der Proben wurde ein Vorlauf von 60 Minuten Dauer bei einer Spannung von 1680 V in TBE-Puffer durchgeführt. Im Anschluss an den Vorlauf wurden je 1,5 µl Sequenzierreaktionsansätze auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 1680 V, einer Stromstärke von 50 mA und einer Temperatur von 51°C in 10 h. Die Detektion erfolgte im Automaten mit Hilfe eines Argon-Lasers, durchgeführt (488 nm und 514,5 nm) durch den die Fluoreszenzfarbstoffe der markierten Trinukleotide zur Lichtemission angeregt wurden. Dieses Emissionsmuster wurde mittels einer CCD-Kamera aufgenommen und über eine entsprechende Software (ABI PRISMA 377 Data Collection Program) ausgewertet.

#### **TBE-Puffer (10-fach)**

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	10 mM

#### **Polyacrylamid-Harnstoff-Lösung**

Harnstoff	21,0 g
30 %ige Acrylamid-Lösung	8,4 ml
TBE (10-fach)	6,0 ml
<i>aqua bidest</i>	20,0 ml

### **4.8 Expression rekombinanter Proteine**

Die Expression rekombinanter Proteine wurde mittels zweier prokaryotischer Expressionssysteme durchgeführt, dem pGex-6P-1-System und dem pQE-System (siehe auch 3.4.1 und 3.4.2)

#### **4.8.1 Expression rekombinanter Proteine mittels des pGex-6P-1-Systems und deren Aufreinigung**

Um die Rate der Expression sowie die Löslichkeit der rekombinanten Proteine in diesem Expressionssystem abschätzen zu können, wurden 300 ml LB - Medium (Zusatz: 100 µg/ml Ampicillin) mit 3 ml einer Übernachtskultur des zu überprüfenden Klons versetzt. Die Inkubation wurde bei einer Temperatur von 37°C auf einem Schüttler bis zu einer  $OD_{595} = 0,5$ , d.h. einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml, durchgeführt. Anschließend wurde 1 ml dieser Kultur als Kontrolle in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und das Sediment in 50 µl Probenpuffer aufgenommen. Die Induktion der Kultur erfolgte durch die Zugabe von 0,3 mM IPTG. Es wurde für weitere drei Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde eine 0,5 ml Probe entnommen (Kontrolle), wie oben behandelt und in 100 µl Probenpuffer resuspendiert. Der Rest der Probe wurde bei 4000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml eiskaltem PBS suspendiert. Anschließend wurde 50 mg Lysozym hinzugegeben und die Lösung 30 min. auf Eis inkubiert. Als nächstes wurde 1 ml Protease Inhibitoren (1. Tabl. In 3 ml Wasser), 125 µl RNase und 125 µl DNase hinzugegeben. Die Zellen wurden per frieren (3 mal 10 min. Trockeneis – Ethanol) und tauen (3 mal 15 min im 37 °C warmen Wasserbad) aufgeschlossen und anschließend bei 4°C für 20 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 ml Glutathion – Sepharose 4B versetzt und für 70 min. auf einem Rad inkubiert. Ein Teil des Pellets wurde in 50 µl Probenpuffer resuspendiert und als Kontrolle verwahrt. Anschließend wurde die Probe 10 min. auf Eis gelagert und danach für 5 min. bei 4°C mit 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt. Das Pellet wurde 2 mal mit je 10 eiskaltem PBS gewaschen, anschließend für 5 min. bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert und dann mit 10 ml Spaltpuffer für 10 min. inkubiert und wiederum 5 min bei 4°C und 500 x g zentrifugiert.

Für die PreScission – Proteasespaltung wurde pro ml Glutathion – Sepharose 40 µl (80 U) PreScission – Protease und 960 µl Cleavage – Buffer



hinzugegeben und üN bei 4°C und leichtem Kippschütteln inkubiert. Das Abtrennen der Glutathion – Sepharose geschah mittels Filtrationssäulchen.

Eine weitere Möglichkeit der Aufreinigung ist der Ultraschall. Hierfür wird, nach Induktion und Zentrifugation, das Pellet in 25 ml PBS resuspendiert und anschließend via Stab – Ultraschall aufgeschlossen. Hierbei kann die Intensität und auch Zeit der Beschallung variiert werden. Wichtig ist, dass das Resupensat nach Ultraschall klar geworden ist.

Die dritte Möglichkeit, die verwendet wurde, ist mittels GuHCL. Hierbei wird pro g Pellet 5 ml GuHCL hinzugegeben, für 1 h geschüttelt und anschließend für 15 min bei 4°C und 14000 x g zentrifugiert. Danach wird der Überstand dekandiert, es werden diesem 10 %iges TCA in gleichem Volumen zugesetzt und anschließend mit den gleichen Einstellungen wie oben zentrifugiert. Der nächste Schritt war eine Ethanolreinigung. Hierfür wurde 100%iges Ethanol im gleichen Volumen zugesetzt. Dieser Ansatz wurde wiederum 15 min. bei 4°C und 14000 x g zentrifugiert. Der überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert.

Der genaue Proteingehalt der Fraktionen wurde mittels einer Proteinbestimmung (siehe 4.9.1), sowie mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Blau-Färbung bestimmt (siehe 4.9.2, 4.9.2.1).

#### ***4.8.2 Expression rekombinanter Proteine mittels des pQE-Systems und deren Aufreinigung***

Vor dem Ansatz größerer Kulturen von transformierten Bakterienzellen wurde eine Überprüfung der Expressionseffizienz des Proteins durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml LB-Medium, welchem 200 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin zugesetzt waren, mit 500 µl einer üN-Kultur beimpft und bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Vor der Induktion der Kultur mit IPTG wurde eine 1 ml Probe entnommen. Die Probe wurde 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 50 µl Probenpuffer aufgenommen. Der Kultur wurde IPTG in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt und der Ansatz für weitere 5 h bei 37°C auf einem Schüttler

inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000 rpm für 3 Minuten sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 50 µl Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließenden Immunoblot.

Für die Gewinnung größerer Mengen des Proteins wurden 1000 ml LB-Medium, plus Ampicillin und Kanamycin mit 5 ml einer üN-Kultur beimpft und bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Vor der Induktion der Expression wurden je 4 x 1 ml Proben entnommen, bei 3000 rpm zentrifugiert und das Bakteriensediment mit je 50 µl Probenpuffer resuspendiert. Diese Proben dienten als nicht induzierte Kontrolle. Die Induktion erfolgte durch Zusatz von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM. Die induzierte Kultur wurde für weitere 5 Stunden auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 4 x 1 ml Proben entnommen, wie oben beschrieben zentrifugiert und in 100 µl Probenpuffer resuspendiert. Diese Proben dienten als induzierte Kontrolle. Anschließend wurde die gesamte Bakterienkultur bei 4000 rpm über 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment über Nacht bei -20°C gelagert.

Das auf Eis aufgetaute Sediment wurde in Puffer A (Lysispuffer) resuspendiert, dazu wurden 5 ml Puffer A pro 1 Gramm Bakteriensediment (Nassgewicht) eingesetzt. Die Lyse erfolgte bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter ständigem Rühren. Im Anschluss wurden die lysierten Bakterien bei 18.000 rpm für 20 Minuten bei 18°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur späteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Das Sediment wurde nochmals in Puffer A resuspendiert und erneut bei 18000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls aufbewahrt, das Sediment wurde bei -20°C gelagert.

Diese Methode der Reinigung von Fusionsproteinen beruht auf einer Chelatbindung, welche sich zwischen der Nickel-nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) und dem sechs Histidine enthaltenden His-Tag ausbildet. Diese sehr spezifische Bindung des *His-Tag* an das Ni-NTA tragende Trägermaterial ermöglicht eine Aufreinigung des Fusionsproteins. Die Bindungskapazität der Ni-NTA Agarose beträgt zwischen 5 und 10 mg Fusionsprotein pro Milliliter. Für die Aufreinigung des Fusionsproteins wurden 5 ml Säulen verwendet. Für die Befüllung der Säulen wurden 2 ml der Ni-NTA Agarose verwendet, welche in einer wässrigen Ethanol-Lösung gelagert wurde. Die Suspension wurde sehr

vorsichtig sedimentiert, der Überstand verworfen, das Sediment in aqua bidest resuspendiert und die Säule mit der Suspension vorsichtig befüllt und für ca. 1 Stunde stehen gelassen, so dass die Ni-NTA Agarose sedimentieren konnte. Anschließend wurde eine Fritte auf die Säule aufgebracht, jedoch ohne das Trägermaterial zu komprimieren. Diese Fritte verhinderte das Trockenlaufen der Säule. Im Anschluss wurde die Säule mit 10 ml aqua bidest gewaschen und mit 10 ml Puffer A äquilibriert. Der vorbereitete Überstand (siehe oben) wurde im Anschluss auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde durch die Säule selbst limitiert und betrug etwa 10 – 15 ml/h. Zur Überprüfung der Bindung des Fusionsproteins wurde jeweils eine 500 µl-Probe des Durchflusses entnommen. Die Säule wurde im Anschluss mit 5 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mittels eines Imidazolstufengradienten. Der Elutionspuffer bestand aus Waschpuffer sowie einer steigenden Imidazolkonzentration. Der Durchfluß wurde je Imidazolkonzentrationsstufe (4 Stufen mit je 3 ml Eluat) getrennt gesammelt und bei -20°C eingelagert. Zum Nachweis des eluierten Fusionsproteins sowie dessen Quantifizierung wurde eine Proteinbestimmung und eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

**Puffer A, Lysispuffer, pH 8,0**

Guanidin HCl	6 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
Tris-HCl	0,01 M

**Waschpuffer, pH 8,0**

Urea	8 M
NaCl	0,1 M
Tris-HCl	0,02 M
Imidazol	0,01 M

**Elutionspuffer 1, pH 8,0**

Urea	8 M
NaCl	0,1 M
Tris-HCl	0,02 M
Imidazol	0,05 M

**Elutionspuffer 2, pH 8,0**

Urea	8 M
NaCl	0,1 M
Tris-HCl	0,02 M
Imidazol	0,1 M

**Elutionspuffer 3, pH 8,0**

Urea	8 M
NaCl	0,1 M
Tris-HCl	0,02 M
Imidazol	0,2 M

**Elutionspuffer 4, pH 8,0**

Urea	8 M
NaCl	0,1 M
Tris-HCl	0,02 M
Imidazol	0,3 M

Der pH-Wert der Puffer wurde jeweils unmittelbar vor dem Gebrauch mit NaOH oder HCl eingestellt.

## **4.9 Proteinchemische und immunologische Methoden**

### **4.9.1 Bio-Rad Protein-Bestimmung**

Die Bio-Rad Proteinbestimmung beruht auf der Methode nach Bradford. Der konzentrierte Farbstoff-Reagenz-Mix wurde zunächst mit aqua bidest 1 zu 4 verdünnt, 100 µl der Proben wurden dann mit 5 ml der vorbereiteten Farbstofflösung vermischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen eine proteinfreie Referenzlösung gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer aus Rinder-Serum-Albumin-Standards ermittelten Eichkurve.

**Farbstoff-Reagenz-Mix (5-fach)**

Phosphorsäure

Methanol

Coomassie brilliant blue G-250

Die genaue Zusammensetzung des Farbstoff-Mixes wurde vom Hersteller (Bio-Rad, Richmond, USA) nicht näher erläutert.

#### **4.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung von Proteingemischen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Laemmli, 1970] [Gallwitz et al., 1978] verwendet. In Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Trenngele verschiedener Polyacrylamid-Konzentrationen ( 10% - 18%) und 3,75 %ige Sammelgele eingesetzt. Die Proben, die im Probenpuffer aufgenommen waren, wurden vor dem Auftragen auf das Gel 5 – 10 Minuten bei 98 °C denaturiert.

Um eine gleichmäßige Laufront und Auftrennung zu erhalten, wurde die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 2mA/cm gestartet. Nach dem Eintritt der Laufront in das Trenngel, wurde die Stromstärke auf 3,5 mA/cm erhöht. Die Elektrophorese wurde unmittelbar nach Austritt der Bromphenolblau-Front aus dem Trenngel beendet. Als Größenstandard zur Abschätzung der jeweiligen Proteingröße wurden jeweils 7,5 µl eines farbig markierten Proteinmarkers (Rainbow-Protein-Molecular-Weight-Marker, Amersham, Braunschweig) verwendet.

##### **Probenpuffer, pH 6,8 (2-fach)**

Tris/HCl	200 mM
β-Mercaptoethanol	2 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
Glycerol	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

##### **Elektrophoresepuffer**

Glycin	200 mM
Tris/HCl	25 mM
SDS	0,10 %

##### **Sammelgel, pH 6,8**

Acrylamid	3,75 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,1 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
APS	0,04 % (w/v)

TEMED	0,1 % (v/v)
Tris/HCl	0,125 M

#### **Trenngel, pH 8,8**

Acrylamid	10 –15 % (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,21 % (w/v)
Glycerol (87 %)	50 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
APS	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)
Tris/HCl	0,37 M

#### **Rainbow™ Protein Molecular Weight Markers (MW 2350-46.000;14.300-220.000)**

Myosin (MW 220.000)	1 mg/ml
Phosphorylase b (MW 97.400)	1 mg/ml
BSA (MW 66.000)	1 mg/ml
Ovalbumin (MW 46.000)	1 mg/ml
Carboanhydrase (MW 30.000)	1 mg/ml
Trypsin-Inhibitor (MW 21.500)	1 mg/ml
Lysozym (MW 14.300)	1 mg/ml
Aprotinin (MW 6.500)	1 mg/ml
Insulin B-Kette (MW 3.400)	1 mg/ml
Insulin A-Kette (MW 2.350)	1 mg/ml
in 50 %iger Glycerin in Wasser	1 mg/ml

#### **4.9.2.1 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung sichtbar zu machen und zu konservieren, wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele für einige Stunden in einer Coomassie brilliant blue Färbelösung inkubiert. Zur Entfärbung wurde eine Methanol/Essigsäure Lösung verwendet.

#### **Coomassie brilliant blue – Färbelösung**

Coomassie brilliant blue G – 250	1 g
----------------------------------	-----

---

Methanol	40 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
<i>ad aqua bidest</i>	

**Methanol/Essigsäure-Lösung**

Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)
<i>aqua bidest</i>	

**4.9.3 Immunoblot-Verfahren**

Um eine Untersuchung der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern zu ermöglichen, ist der Einsatz von Blot-Verfahren notwendig. Hierbei werden die zuvor aufgetrennten Proteine mittels des Halbtrockenblot-Verfahrens [Kyhse-Anderson, 1984] bzw. Nass-Blot-Verfahrens [Towbin et al., 1979] auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies führt zu einer irreversiblen Bindung der übertragenen, denaturierten Proteine an die negativ geladene Nitrocellulose. Die auf der Nitrocellulose fixierten Proteine sind dadurch für die Bindung durch spezifische Antikörper zugänglich. Alle im folgenden nicht näher beschriebenen Inkubations- und Waschschrte wurden auf einem Schwenker bei Raumtemperatur durchgeführt.

**4.9.3.1 Halbtrockenblot-Verfahren**

Der Blot erfolgte unter Verwendung zweier Graphit-Plattenelektroden. Auf die untere Plattenelektrode (Anode) wurden sechs in Anodenpuffer 1 getränkte, entsprechend der Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere, aufgelegt. Über diese Filterpapiere wurden 3 in Anodenpuffer 2 getränkte Filterpapiere gelegt und darüber die in *aqua bidest* befeuchtete Nitrocellulose. Anschließend wurde das Gel und über diesem neun in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Bei dem Auflegen der einzelnen Filterpapiere, der Nitrocellulose sowie des Gels muss die Bildung von Luftblasen vermieden werden. Im Anschluss wurde die

zweite Graphit-Plattenelektrode (Kathode) aufgelegt. Der Proteintransfer wurde bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  über 1,5 Stunden durchgeführt. Um die nach Abschluss des Übertrags freien Proteinbindungsstellen der Nitrocellulose abzusättigen, wurde diese über mehrere Stunden in Absättigungspuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die abgesättigte Nitrocellulosemembran zweimal in Blot-PBS (0,1 % Tween-20 (v/v)) gewaschen. Die verwendete Membran entweder sofort weiterbearbeitet oder getrocknet und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **Anodenpuffer 1**

Tris	300 mM
Methanol	20 % (v/v)

#### **Anodenpuffer 2**

Tris	25 mM
Methanol	20 % (v/v)

#### **Kathodenpuffer, pH 9,4**

Tris/HCl	25 mM
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	40 mM
Methanol	20 % (v/v)

#### **Absättigungspuffer**

BSA	3 % (w/v)
NaCl	200 mM
$\text{NaN}_3$	0,02 % (w/v)

#### **PBS-Puffer** (siehe 3.7)

#### **Blot-PBS**

NaCl	200 mM
PBS-Puffer (pH 7,4)	

#### **4.9.3.2 Nass-Blot-Verfahren**

Diese Methode bedient sich einer Nassblotkammer, welche vollständig mit Transferpuffer befüllt ist. Gel und Nitrocellulose werden unter Vermeidung von Luftblasen aufeinander gebracht. Diese werden dann mit Filterpapier (in Transferpuffer getränkt) auf beiden Seiten bedeckt und anschließend in der



Blotkammer montiert. Diese wird dann mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 300 mA und einer Temperatur von 4°C über 16 Stunden.

#### **Transferpuffer pH 8,3**

Tris/HCl	20 mM
Glycin	150 mM
Methanol	20 % (v/v)
<i>aqua bidest</i>	

#### **4.9.3.3 Immunofärbung der Immunoblots**

Die Membranen wurden über Nacht mit spezifischen Erst-Antikörpern bzw. humanen Seren in geeigneten Verdünnungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal für fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde mit einem 1: 500 in Verdünnungspuffer verdünnten Peroxidase gekoppelten species-spezifischen Zweit-Antikörper, der gegen den entsprechenden Erstantikörper gerichtet ist, inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde je zweimal mit Waschpuffer bzw. Blot-PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe der Färbelösung (Chromogen/Substrat) die Färbung eingeleitet. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit H<sub>2</sub>O abgestoppt und der Blot luftgetrocknet.

#### **PBS-Puffer pH 7,4 (siehe 3.7)**

##### **Verdünnungspuffer**

BSA	3 % (w/v)
FKS	5 % (v/v)
Tween-20	0,10 % (v/v)
NaCl	200 mM
PBS-Puffer (pH 7,4)	

##### **Waschpuffer**

NaCl	300 mM
------	--------

Tween-20	0,3 % (v/v)
PBS-Puffer (pH 7,4)	

**Blot-PBS**

NaCl	200 mM
PBS-Puffer (pH 7,4)	

**Färbelösung**

4-Chloro-1-naphtol	18 mg
Methanol	5 ml
Blot-PBS	45 ml

Der Färbelösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch 70 µl 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt.

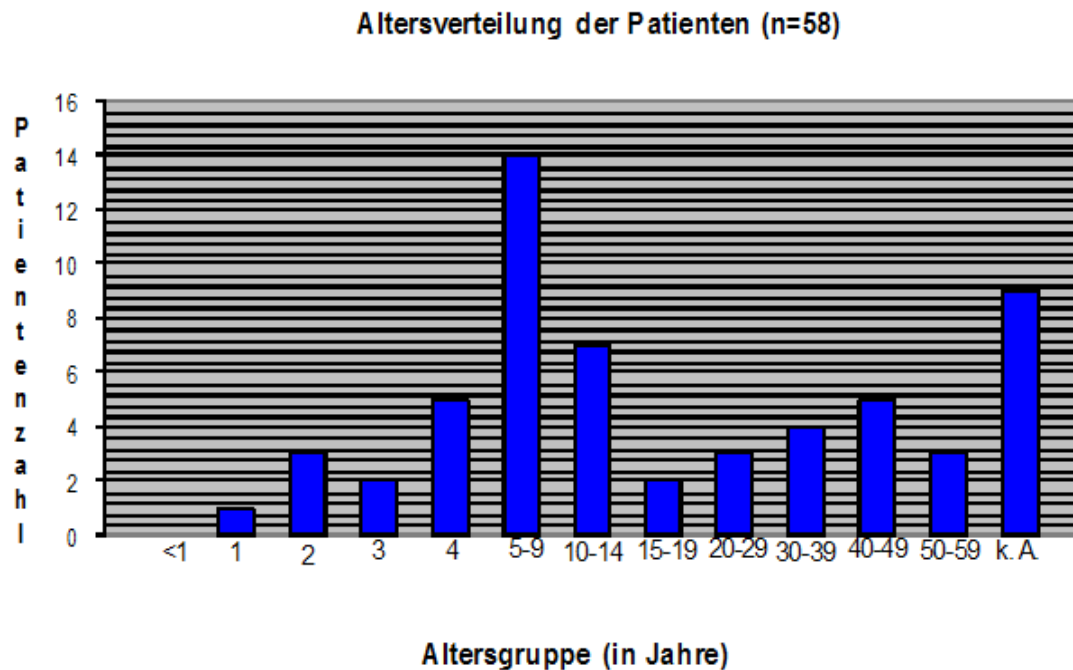
#### 4.10 Präparative Proteinreinigung mittels FPLC (*Fast-Protein Liquid Chromatography*)

Die säulenchromatographische Proteinreinigung wurde mit dem ÄKTA-FPLC Chromatographie-System der Fa. Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Mit dem System wurden zahlreiche Kombinationen flüssigkeitschromatographischer Methoden zur Reinigung der gewünschten Proteine getestet. Dies waren Ausschluss- /Molekularsiebchromatographie (*SEC, size exclusion chromatography*) Ionenaustauschchromatographie (*IEX, ion exchange chromatography*) Hydrophobe Interaktionschromatographie (*HIC, hydrophobic interaction chromatography*) Affinitätschromatographie (*IMAC, immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie*)

Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe der Gerätesoftware UNICORN 3.10 ausgewertet und bearbeitet. Vor dem Injizieren wurden die Proben stets mit Hilfe eines Spritzenfilters (*Millex-GV der Fa. Millipore*) der Porengröße 0,22 µm filtriert.

## 4.11 Methodik der Studie zum Nachweis von Influenza aus Saliva

### 4.11.1 Studienteilnehmer



**Abb. 15: Altersverteilung der Studienteilnehmer**

Aus verschiedenen Praxen in Deutschland wurden uns Proben von 58 Patienten geschickt, die das klinische Bild einer Influenza und einen positiven Schnelltest hatten. Das Geschlecht wurde uns nicht mitgeteilt, das Altersspektrum reichte von 1 Jahr bis 54 Jahre, bei einem errechneten Median von 17,5 Jahren. Bei neun Patienten fehlte eine Altersangabe. Die Altersverteilung ist in Abb. 3.1 wiedergegeben.

### 4.11.2 RNA Extraktion und PCR

Aus den Saliva-Proben wurde die enthaltene RNA mit Hilfe des RNAeasy Kit (Qiagen) extrahiert. Die so gewonnenen Proben wurden mittels Nested-

Multiplex-PCR [J. Stockton et al., 1998] auf Influenza-spezifische RNA getestet. Die eingesetzte Multiplex-PCR kann RNA-Fragmente von Influenza A (H1, H3), Influenza B (HA), RSV A und RSV B nachweisen.

#### 4.11.3 Vorversuche

Zunächst wurde von uns die Sensitivität der verwendeten PCR unter den bei uns vorliegenden laborativen Bedingungen getestet und eingestellt. Als Ausgangsmaterial diente der Influenzastamm A/WSN/33 (H1N1) mit  $2 \times 10^6$  FU/ml. Von diesem wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe angelegt ( $10^{-1}$  –  $10^{-8}$ ) und nach RNA-Extraktion mittels Multiplex- und Nested Multiplex-PCR analysiert.

Zusätzlich musste, bevor mit der eigentliche Testreihe begonnen werden konnte, geklärt werden, ob die transportbedingte Inkubation der Influenza-RNA in Saliva bei Raumtemperatur zu RNA-Degradation führt und damit das Testergebnis verfälscht werden könnte. Zu diesem Zweck wurden 1,5 ml Saliva mit Influenza A/WSN/33 (H1N1) und Influenza A/HK-WSN (H3N1) versetzt und bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden Proben entnommen, die RNA wurde extrahiert und mittels Nested Multiplex PCR analysiert.

#### 4.11.4 FLU A/B Rapid Assay (Roche)

Dieser Schnelltest, ein Diagnostikum ausschließlich für Forschungs- und Evaluierungszwecke, wurde als Auswahlkriterium für die Studienteilnehmer benutzt. Patienten mit einem positiven Ergebnis gaben eine Saliva-Probe ab.

Der Test weist ein mit der viralen Nukleinsäure assoziiertes Virusantigen nach. Zur Freisetzung des Antigens wird die Virushülle mit Hilfe einer Lyse-Lösung lysiert. Da das Antigen typspezifisch ist, verwendet der Test zwei Antikörperpaare, eines mit Influenza A- und eines mit Influenza B-Spezifität. Die einzelnen Antikörper eines Antikörperpaares sind entweder mit Biotin oder Digoxigenin konjugiert.

Der, in Gegenwart des Virusantigens entstehende Komplex aus biotinkonjugiertem Antikörper, Antigen und digoxigeninkonjugiertem Antikörper

wird durch einen in das Reaktionsgefäß gestellten Teststreifen sichtbar gemacht.

Als Probenmaterial dient ein Rachenabstrich.

#### **4.11.5 Konzentration von Influenzaviren aus Saliva**

Zur Anreicherung von Influenzaviren werden native oder Glutardialdehyd-fixierte Hühnerythrozyten, nach Absättigung des Vernetzungsreagenzes und gründlicher Waschungen, mit der Virussuspension inkubiert, gewaschen und sedimentiert. Im Anschluss an die Bindung erfolgt die Elution der Viren durch die Behandlung mit Neuraminidase. Die Bindung erfolgt auf Eis, da unter diesen Bedingungen in der Regel die Influenzavirus eigene Neuraminidase kaum enzymatische Aktivität zeigt. Diese Methode ist allerdings nicht für alle Influenza Subtypen erfolgreich, da einige eine gesteigerte Neuraminidaseaktivität zeigen. Daher versuchten wir zusätzlich, die Virus eigene Neuraminidase eines Subtyps (WSN) durch einen Neuraminidase-Inhibitor zu hemmen.

Diese Methode konnte im laborativen Maßstab für das Geflügelpestvirus (KP) etabliert werden.

#### **4.11.6 Vorversuch für Anreicherung von Influenzaviren aus Saliva**

Um die oben beschriebene Methode zu etablieren, war es nötig, im vor hinein abzuklären ob und in wie weit das Bindungsvermögen der Viren durch das Probenmaterial Saliva beeinflusst wird. Dazu wurden Influenzaviren (WSN oder KP) in Saliva gespickt (1:10). Dieses Material wurde anschließend für einen Hämagglutinationstest eingesetzt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Identifizierung neuer Influenza – Proteine

Aus der Primärsequenz der Influenza A Viren können zwei potentielle alternative offene Leserahmen (ORF) deduziert werden, die im Folgenden als N1' und NP' bezeichnet werden. Diese RNA – Fragmente wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert. N1' stammt aus dem RNA-Segment, welches bei Influenza A für die Neuraminidase kodiert. NP' konnte auf dem Segment, welches für die Nukleoproteine kodiert, deduziert werden.

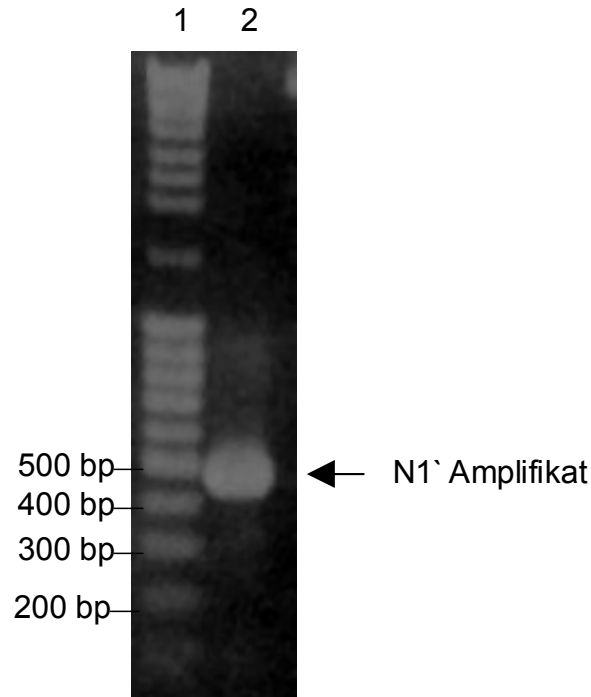
### 5.2 Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von N1'

#### 5.2.1 Amplifikation von N1'

Für die Amplifikation von N1' mittels Polymerase-Kettenreaktion wurden geeignete Oligonukleotide ausgewählt. Die verwendeten Oligonukleotide enthielten nicht nur die entsprechenden komplementären Basen-Sequenzen sondern auch überhängende Nukleotide, die der Einfügung der bei späteren Subklonierungen notwendigen Restriktionsenzym-Schnittstellen dienten. Der Vorwärts-Primer (pGex-6P-1N1' EcoRIhin) enthielt eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI und der Rückwärts Primer (pGex-6P-1N1' XhoIrück) eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease XhoI. Die PCR wurde mittels des Advantage™ Genomic PCR Kit (Clontech, Heidelberg) durchgeführt. Die verschiedenen Zykluslängen und Temperaturen wurden entsprechend dem Temperaturoptimum sowie der Syntheserate der DNA-Polymerase gewählt. Es wurden 4 ng virale cDNA als Matrize verwendet. Die entsprechenden Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 35 pmol – 80 pmol eingesetzt. Nach Amplifikation erfolgte der Nachweis des Amplifikats

mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese, wobei die erwartete Größe des Fragments von 460 bp bestätigt werden konnte.

In Abb. 16 erkennt man in Spur 2 das N1'-Amplifikat, welches sich bei den vorher berechneten 460 bp befindet. Somit konnte eine erfolgreiche Amplifikation von N1' nachgewiesen werden.



**Abb. 16: Amplifikation von N1' mittels Agarosegel-Elektrophorese**

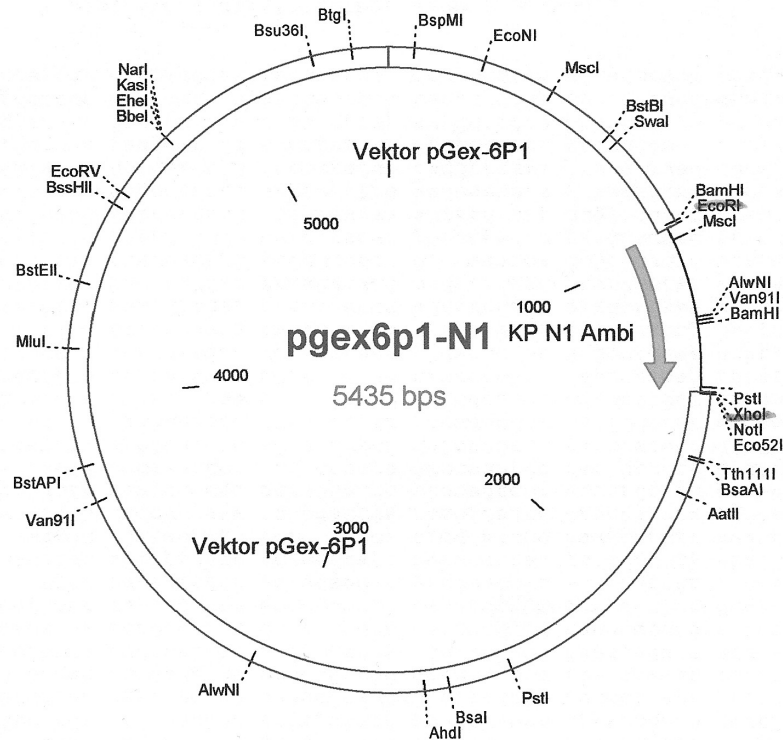
Darstellung des N1' nach Amplifikation (Spur 2, 460 bp). DNA Ladder Mix in Spur 1

### 5.2.2 Subklonierung von N1' in den Expressionsvektor pGex-6P-1

Für die Subklonierung von N1' in den Vektor pGex-6P-1 wurde der Vektor zunächst mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI bei 25°C im Wasserbad über 1,5 Stunden verdaut und anschließend von Enzymen und Salzen gereinigt.

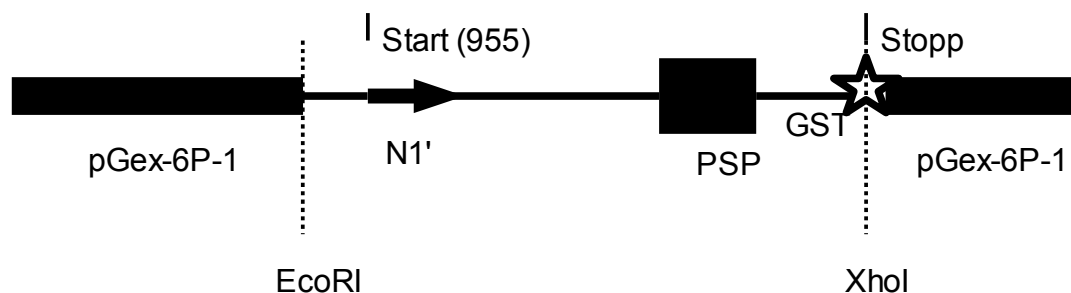
Durch Klonierung von N1' in den Vektor pGex-6P-1 entsteht zusätzlich noch ein Fusionsprotein, welches am N-terminal aus Glutathion S-Transferase (GST) besteht. Verbunden ist diese über ein sog. Linkerpeptid, welches durch die PreScission™ Protease gespalten wird. Es handelt sich um die Aminosäuresequenz L-E-V-L-F-Q-G-P, die von der PreScission™ Protease (PSP) zwischen Q und G spezifisch gespalten wird. Die PSP ist ein Fusionsprotein aus der 3C Protease des humanen Rhinovirus Typ 14 und der

Glutathion S-Transferase. Daher sollte nach Expression ein Protein mit der Größe von ca. 41 kDA entstehen, da GST ca. 26 kDA groß ist und N1' 15 kDA. Abb. 17 zeigt eine schematische Darstellung des Vektors pGex-6P-1 mit inseriertem N1'.



**Abb. 17: Vektorbild von pGex-6P-1 nach Insertion von N1'**

Man erkennt die möglichen Restriktionsschnittstellen des Vektors. Bei unserem Konstrukt wurden EcoRI und XhoI als Restriktionsendonukleasen verwendet.



**Abb. 18: Schematische Darstellung der Klonierung von N1' in pGex-6P-N1**

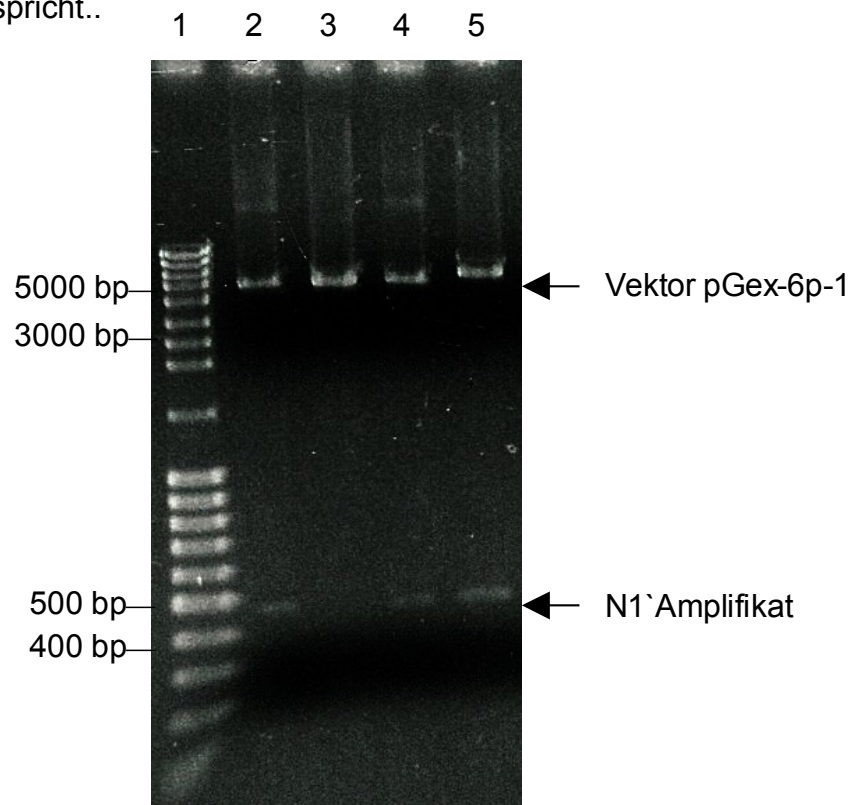
### 5.2.3 Transformation in E.coli und Überprüfung des pGex-6P-1 Konstrukts

E. coli DH5 $\alpha$  wurden mit dem Ligationsansatz des N1'-pGex-6P-1-Konstrukts transformiert und eine Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab durchgeführt.



Es folgte anschließend die Restriktion mit EcoRI und XhoI. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese, wobei die erwarteten DNA-Fragmente von 460 bp (N1'), und 4984 bp (pGex-6P-1 Vektor) nachgewiesen werden konnten. Dies ist in Abb. 19 in den Spuren 2, 4 und 5 zu erkennen.

Im Gegensatz dazu zeigt Spur 3 in Abb. 19 ein DNA-Fragment, welches dem Vektor entspricht..



**Abb. 19: Agarosegel-Elektrophorese nach Transformation des Vektor-Konstrukts in E.coli**  
In den Spuren 2-5 laufen Plasmid-Präparationen von unterschiedlichen E. coli Klonen. In Spur 2,4 und 5 erkennt man neben dem Vektor auch das N1' Amplifikat (Spur bei 460 bp). Dies spricht für eine erfolgreiche Insertion. DNA Ladder Mix in Spur 1

#### 5.2.4 Sequenzierung des pGex-6P-1 Konstrukts

Für die Überprüfung der inserierten DNA-Fragmente durch Sequenzierung, war eine Plasmid-Präparation im großen Maßstab erforderlich. Zum Sequenzieren wurden die Oligonukleotide pGex-6P-1N1'EcoRIhin und pGex-6P-1N1'XhoIrück verwendet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Programms *Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources* (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Die Übereinstimmung mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz von Influenza ergab einen Wert von 100%.

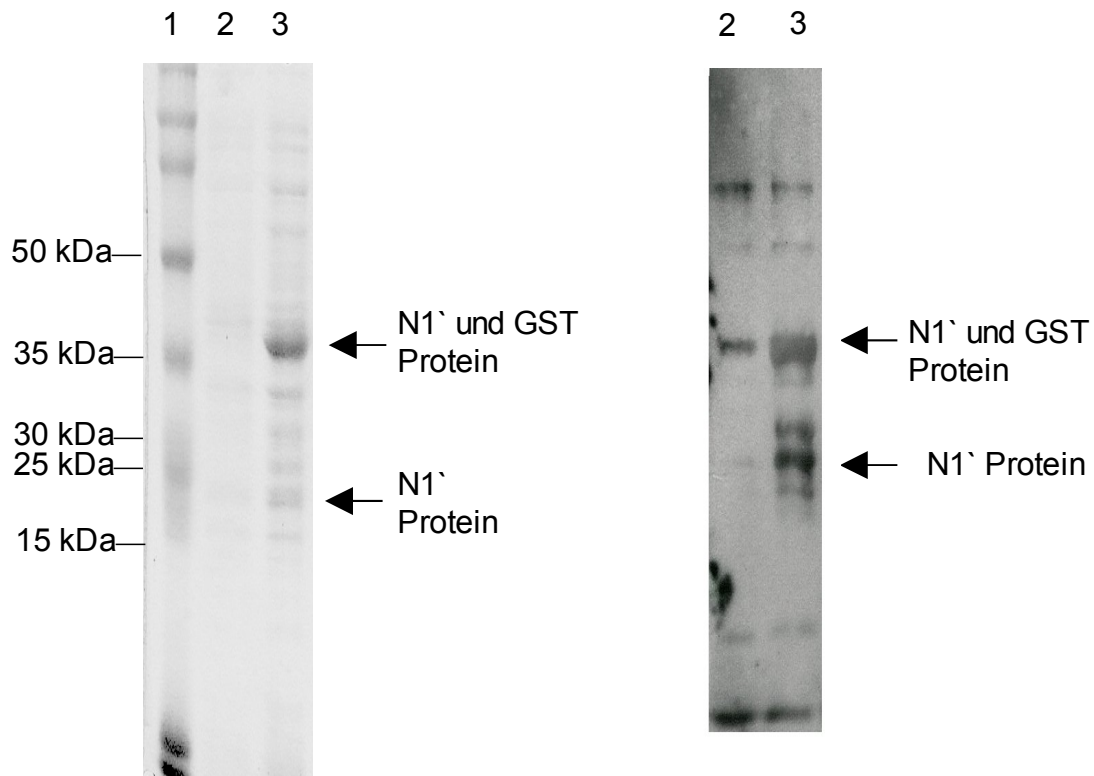
### 5.3 Expression und Aufreinigung von N1'

#### 5.3.1 Expression von N1'

Die Expression von N1' wurde durch IPTG-Induktion der mit dem rekombinanten Vektor pGex-6P-1 transformierten Bakterienzellen erreicht. Die Überprüfung der Expression erfolgte durch Coomassie-Färbung nach Auftrennung mittels SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese und durch den Nachweis der Reaktivität des exprimierten Produkts mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot.

Transformierte *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden üN angezüchtet und 1 ml der üN-Kultur für die Beimpfung von 100 ml eines mit Ampicillin versetzten LB-Mediums verwendet, welches anschließend bis zu einer  $OD_{595\text{ nm}} = 0,6$  bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert wurde. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zusatz von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM, nachdem Kontrollproben entnommen worden waren. Nach IPTG-Zusatz wurde die Kultur für weitere 5 Stunden auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Vor der weiteren Verarbeitung der Bakterienzellen wurden noch einmal Kontrollproben entnommen, die nach elektrophoretischer Auftrennung untersucht wurden. Das Coomassie-gefärbte Gel bzw. der Immunoblot bestätigte die Expression von N1'.

Abb. 20 zeigt jeweils in Spur 2 die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. Hier ist sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch im Immunoblot nur eine kleine Bande erkennbar. Nach Induktion mit IPTG (Spur 3) zeigt sich eine deutlich dickere Bande. Dies zeigt, dass sich die Proteinbiosynthese durch IPTG induzieren lassen kann. Das Proteinprodukt von N1' zeigt sich durch eine Bande bei ca. 17,5 kDa. Rechnerisch müsste das Protein ca. 15 kDa schwer sein, da N1' aus 460 bp besteht, was für ein Protein aus ca. 150 Aminosäuren kodiert. Zusätzlich zeigt sich auf den beiden Bildern eine große Bande bei ca. 40 kDa, welche N1' verbunden mit GST entspricht. Dies zeigt, daß auch vor Behandlung mit PSP bereits N1' von GST abgespalten wird, a.e. durch Degradation.



**Abb. 20: Expression von N1' in *E. coli* und Darstellung im Coomassie-gefärbten Gel und im Immunoblot**

In Spur 2 läuft die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. In Spur 3 zieht man die Probe nach IPTG-induzierter Proteinbiosynthese. Rainbow Marker RPN 800 in Spur 1

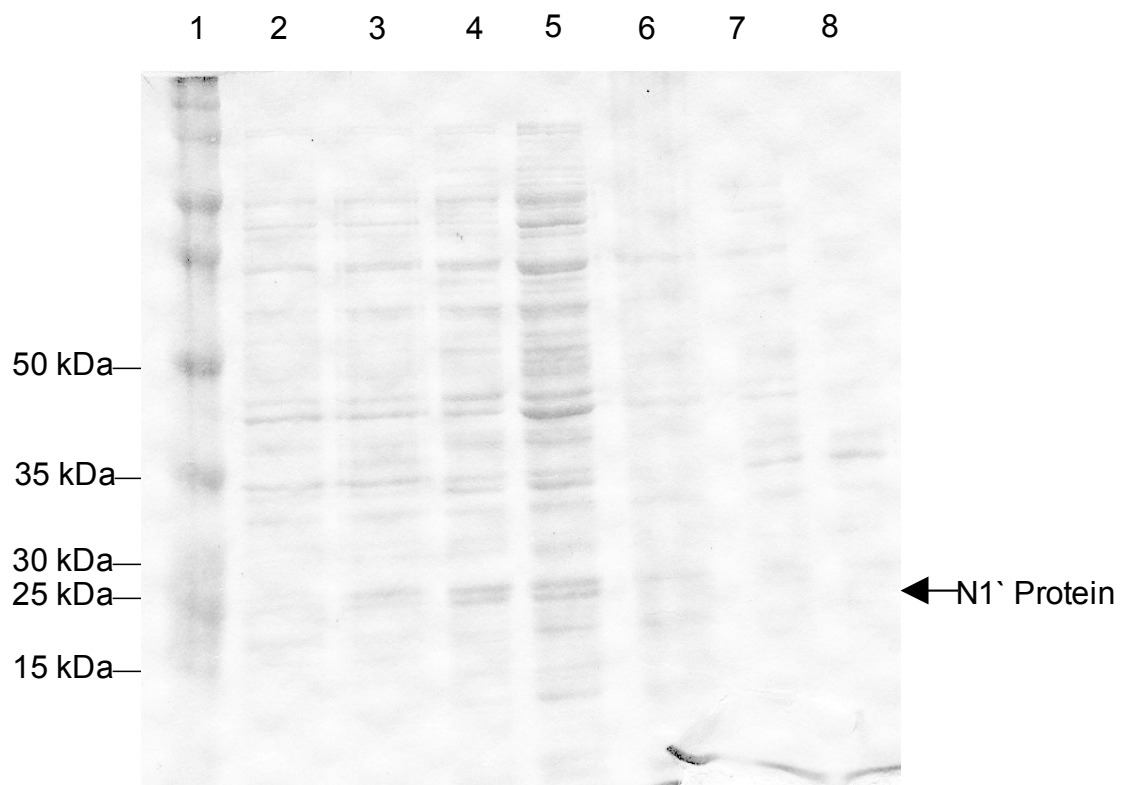
### 5.3.2 Aufreinigung von N1'

Um die geplanten serologischen Untersuchungen durchführen zu können, war eine Aufreinigung von N1' notwendig. Hierfür wurden verschiedene Aufreinigungsprotokolle verwendet.

Als erstes wurden drei Ansätze, jeweils 1000 ml eines mit den entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Mediums mit 5 ml einer frischen üN-Kultur des jeweiligen Klons beimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer  $OD_{595\text{ nm}} = 0,6$  inkubiert. Die Induktion wurde mit dem Zusatz von 1 mM IPTG durchgeführt. Die Kultur wurde anschließend für 5 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Jeder dieser drei Ansätze wurde nun mit einem anderen Aufreinigungsverfahren behandelt. Hierfür wurde die Reinigung mittels Glutathion-Sepharose 4B, mit Ultraschall und mit Glu-HCL durchgeführt. Die Überprüfung der Aufreinigung geschah zum einen durch die SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassie – Färbung und zum anderen durch Immunoblot.

Abb. 21 zeigt die Kontrolle der verschiedenen Aufreinigungsprotokolle im Coomassie-Gel. Man erkennt in der 3. Spur eine Zunahme der Bande bei ca. 17,5 kDa im Vergleich zur 2. Spur. Dies entspricht dem N1' Protein nach Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. Spur 4 zeigt den Überstand nach Aufreinigung mittels Ultraschall über 3 x 15 sec. bei 7 V. Spur 7 zeigt das Pellet nach Aufreinigung mittels Ultraschall. Analog hierzu zeigt Spur 5 den Überstand nach Aufreinigung mit Glutathion-Sepharose 4B und Spur 8 das Pellet. In Spur 6 ist der Überstand nach Aufreinigung mittels Gu-HCL aufgetragen.

In Spur 4 und 5 ist eine Bande bei ca. 17,5 kDa zu detektieren, In den Coomassie-gefärbten Gelen treten sehr viele unspezifische Banden auf. Daher musste davon ausgegangen werden, dass die Aufreinigungen nicht suffizient möglich waren. N1' wurde in den Vektor pQE 30 klonieren, der His-Tag zur Aufreinigung aufweist.



**Abb. 21: Aufreinigung des N1' Proteinproduktes nach verschiedenen Protokollen und anschließender Kontrolle im Coomassie-Gel**

In Spur 2 läuft die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. In Spur 3 die Probe nach IPTG-induzierter Proteinbiosynthese. Die Spuren 4-8 zeigen die Ergebnisse mehrerer Aufreinigungsprotokolle. Rainbow Marker RPN 800 in Spur 1

## 5.4 Klonierung von N1' aus pGex – 6P – 1 Konstrukt in den Expressionsvektor pQE 30

### 5.4.1 Klonierung in pQE 30

Das Konstrukt pGex – 6P – 1 – N1' wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI geschnitten. Der geschnittene Vektor und N1' wurden mittels eines Agarosegels getrennt. N1' wurde aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. Der nächste Schritt war eine PCR von N1' mit den Primern pQE30N1' SACIhin und pQE30N1' HindIIIrück. Hierdurch entstanden Schnittstellen für SACI und HindIII, die später zur Ligation in den Vektor pQE 30 genutzt wurden.

Durch die Klonierung von N1' in pQE 30 wird zusätzlich N-terminal ein HIS-Taq fusioniert. Hierdurch entsteht ein chimäres Protein, welches sich durch spezifische HIS-Antigene nachweisen lässt.

Anschließend wurde mit diesem Konstrukt in gleicher Weise vorgegangen wie mit dem pGex – 6P – 1 Konstrukt, mit dem Unterschied, dass als Restriktionsenzyme SACI und Hind III verwendet wurden.

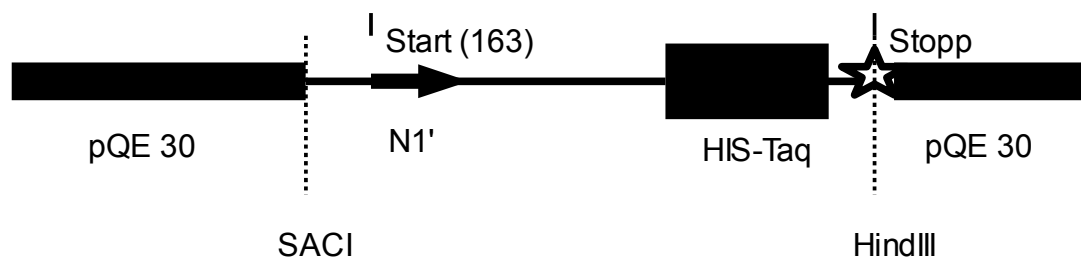


Abb. 22: Schematische Darstellung des pQE 30-N1' Konstruktes

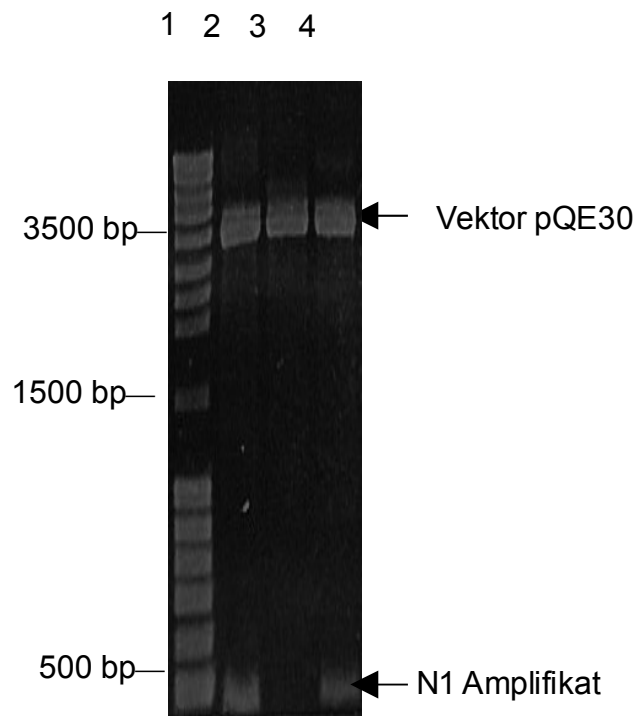
### 5.4.2 Transformation in E. coli und Überprüfung des pQE – N1' Konstrukts

Es wurden die gleichen Techniken wie bei den entsprechenden Arbeiten am pGex – 6P – 1 Konstrukts angewendet (s. 5.2.3). Allerdings wurde der E.coli Stamm M15 pREP 4 eingesetzt.

Zur Überprüfung des Konstruktes wurde eine Plasmid – Präparation im kleinen

Maßstab mit anschließender Restriktion mit *SacI* und *HindIII* durchgeführt. Diese wurde mit Hilfe einer Agarosegel – Elektrophorese ausgewertet.

Abb. 23 zeigt in den Spuren 2 und 4 eine erfolgreiche Insertion von N1' in den Vektor pQE 30. Die Bande für N1', die bei ca. 460 bp läuft und zum anderen die Bande für den Vektor, der eine Größe von 3500 bp hat. Spur 3 zeigt die Bande für den Vektor.



**Abb. 23: Kontrolle der Klonierung von N1' aus pGex-6P-1 in pQE-30, anschließender Plasmid-Präparation und Restriktion mit *SacI* und *HindIII* im Agarosegel**

In den Spuren 2-4 wurden Plasmid-Präparationen von unterschiedlichen *E. coli* Klonen aufgetragen. In Spur 2 und 4 erkennt man neben dem Vektor auch das N1' Amplifikat (Spur bei 460 bp). Dies spricht für eine erfolgreiche Insertion. DNA Ladder Mix in Spur 1

#### 5.4.3 Sequenzierung des pQE 30 Konstrukts

Für die Überprüfung der inserierten DNA-Fragmente durch Sequenzierung, war, wie schon beim pGex-6P-1-N1'-Konstrukt gezeigt, eine Plasmid-Präparation im großen Maßstab erforderlich.

Zum Sequenzieren wurden die Oligonukleotide pQE30N1' *SacI*hin und pQE30N1' *HindIII*rück verwendet. Der Primer pQE30N1' *SacI*hin bindet in 5' Richtung von der Polylinkerregion, der Primer pQE30N1' *HindIII*rück in 3' Richtung. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Programms

*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources* (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Die Übereinstimmung mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz von Influenza ergab 100%ige Identität.

## **5.5 Expression und Aufreinigung des N1' aus dem pQE 30 Konstrukt**

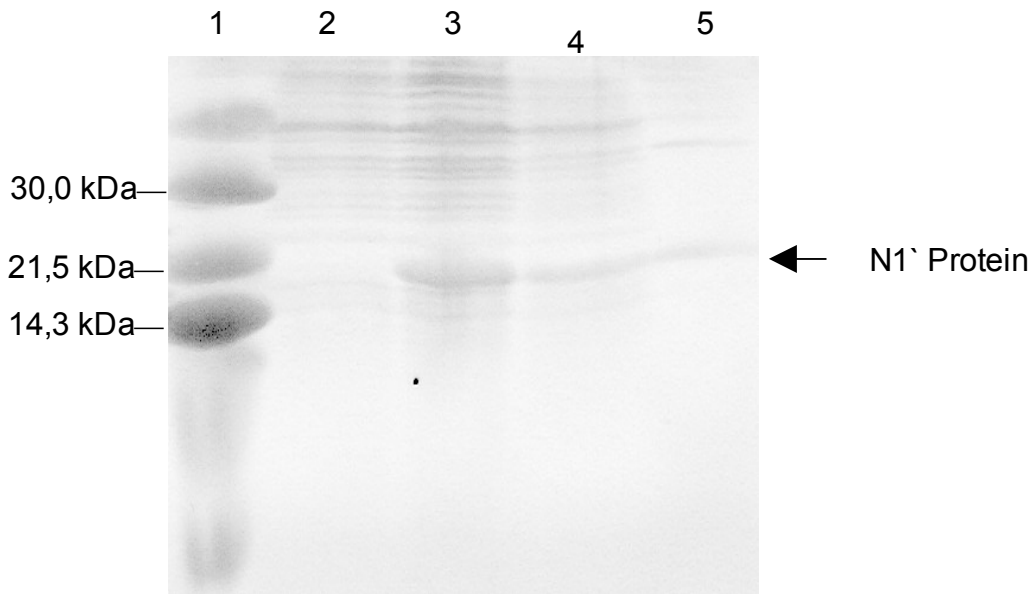
### **5.5.1 Expression und Aufreinigung des N1'**

Die Reinigung des Proteins erfolgte mit Hilfe von Ni-NTA-Harz befüllten Polypropylensäulen (Bettvolumen: 2 ml). Die Beladungs- sowie die Elutionsflußgeschwindigkeit wurde durch die Säulen selbst limitiert; sie entsprach etwa 10 – 15 ml/h. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mittels eines Imidazolgradienten. Während der Reinigung wurde vor und nach jedem Schritt eine Probe zur späteren Auswertung mittels Coomassie-gefärbtem Agarosegel asserviert. Auf dem gefärbtem Gel sind noch etliche unspezifische Banden zu erkennen. Daher wurde die Methode der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Harz verlassen und es wurde nun versucht, die Bakterien mit Hilfe von 8 M Urea und anschließend Ultraschall aufzuschließen und anschließend mittels FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography) das N1' zu reinigen. Hierfür wurden die Bakterien nach Expression und Zentrifugation nicht mehr in PBS resuspendiert, sondern in 8 M Harnstoff. Dieses Gemisch wurde dann solange mit Ultraschall behandelt, bis die Suspension klar und durchscheinend wurde. In dem durchgeführten Kontroll-Gel konnte N1' als Bande bei ca. 17 kDa nachgewiesen werden (s. Abb. 24 und Abb. 25). Es zeigte sich, dass es nicht möglich war, N1' komplett in Lösung zu bringen. Ein gewisser Teil des Proteins fiel aus und blieb im Pellet zurück (s. Abb. 24 und 25 Spur 5). Zusätzlich zeigte sich im Immunoblot unter Verwendung eines Antikörpers gegen den His-Tag, das sich N1' zu Dimeren zusammenlegt, da eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 42 kDa nachgewiesen werden konnte.

Anschließend wurde der Überstand mittels FPLC gereinigt. Es wurde jeweils

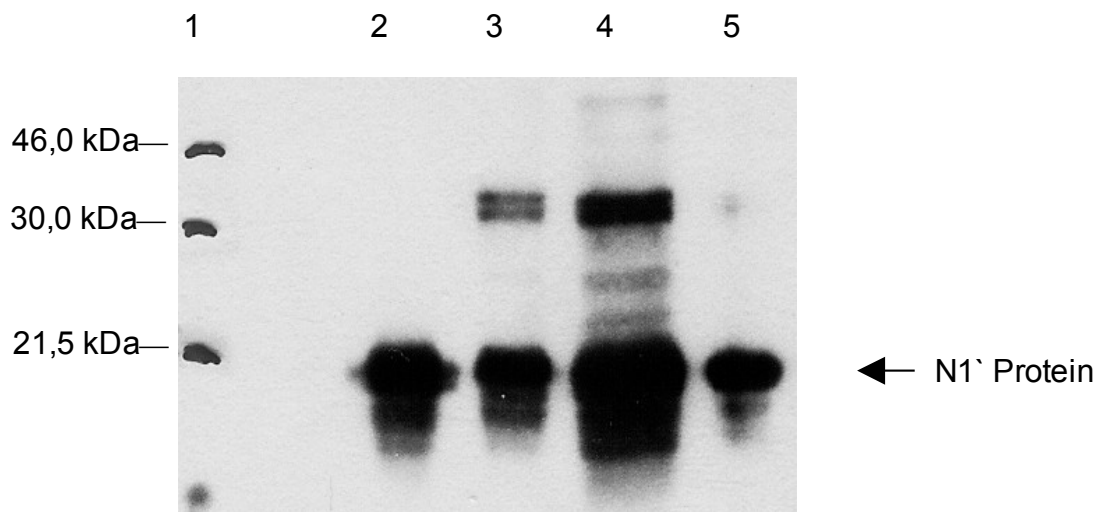
das Eluat in 1ml Schritten aufgefangen. Die Überprüfung der Aufreinigung erfolgte durch die SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassie – Färbung oder durch Immunoblot.

Wie in Abb. 27 und 28 zu sehen ist, zeigt sich eine Bande bei ca. 17 kDa, welche N1' entspricht.



**Abb. 24: Aufreinigung des Proteinproduktes von N1' mit 8 M Harnstoff im SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung**

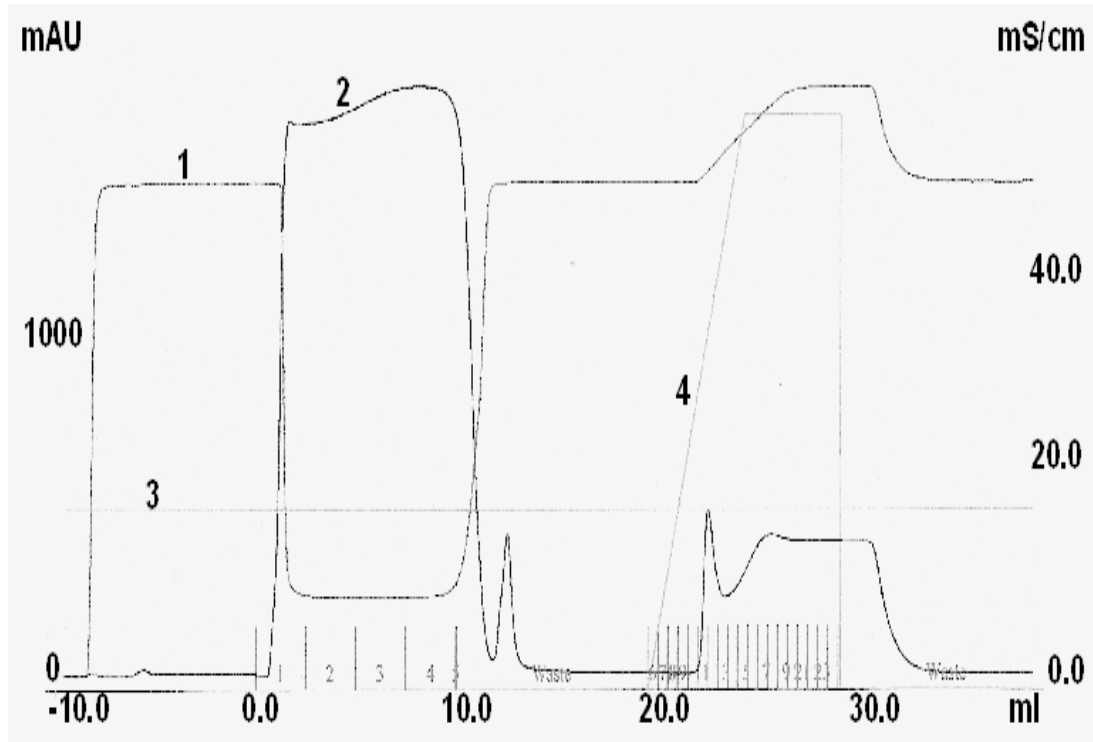
In Spur 2 läuft die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. In Spur 3 sieht man die Probe nach IPTG-induzierter Proteinbiosynthese. Spur 4 zeigt den Überstand nach Behandlung mit 8M Urea und Spur 5 das Pellet nach 8M Urea und anschließender Zentrifugation. Rainbow Marker RPN 755 in Spur 1



**Abb. 25: Aufreinigung des Proteinproduktes von N1' mit 8 M Harnstoff im Immunoblot unter Verwendung eines Antikörpers gegen den His-Tag**



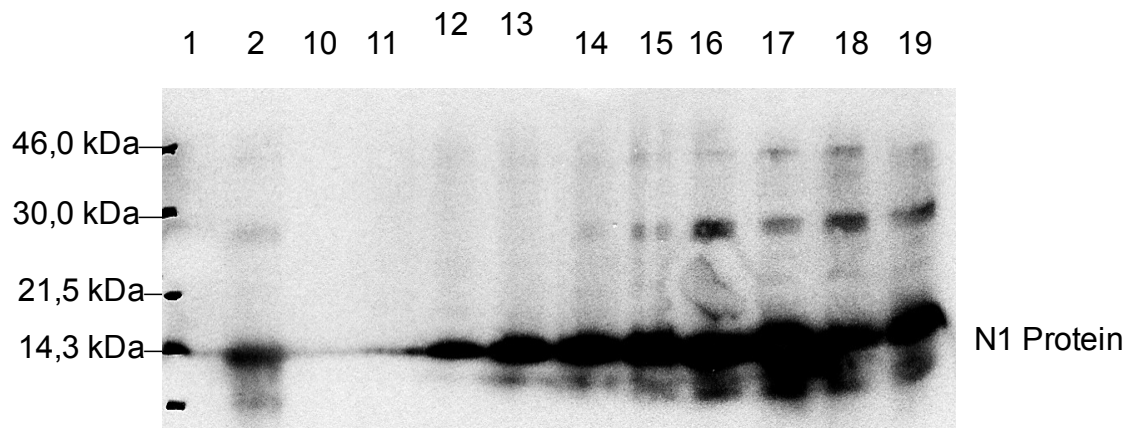
In Spur 2 läuft die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. In Spur 3 sieht man die Probe nach IPTG-induzierter Proteinbiosynthese. Spur 4 zeigt den Überstand nach Behandlung mit 8M Urea und Spur 5 das Pellet nach 8M Urea und anschließender Zentrifugation. Rainbow Marker RPN 755 in Spur 1



**Abb. 26: Flussdiagramm der Aufreinigung von N1' mittels FPLC**

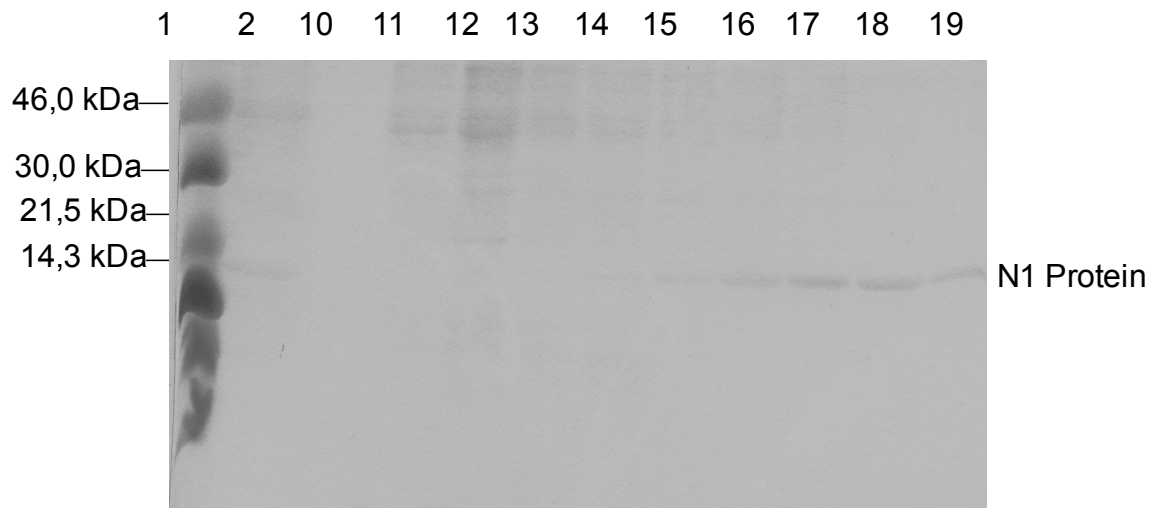
1: HiTrap Chealting Cond, 2: HiTrap Chealting UV, 3: HiTrap Chealting pH, 4: HiTrap Chealting Conc, 1-23: gesammelte Fraktionen

Das Diagramm zeigt die Aufreinigung und die gesammelten Fraktionen des aufgereinigten N1'. Anschließend wurden die Fraktionen mittels Coomassie-Gel und Immunoblot ausgewertet.



**Abb. 27: Immunoblot der Aufreinigung von N1' mit FPLC**

In Spur 2 läuft der Überstand der N1'-Expression vor FPLC. Die Spuren 10-19 bezeichnen jeweils die gesammelte Fraktion nach FPLC, wobei die Spurangabe gleich der Nummer der Fraktion ist (vergl. Abb. 24). Rainbow Marker RPN 755 in Spur 1



**Abb. 28: SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung der Aufreinigung von N1' mit FPLC**

In Spur 2 läuft der Überstand der N1'-Expression vor FPLC. Die Spuren 10-19 bezeichnen jeweils die gesammelte Fraktion nach FPLC, wobei die Spurangabe gleich der Nummer der Fraktion ist (vergl. Abb. 4.9). Rainbow Marker RPN 755 in Spur 1

## 5.6 Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von NP'

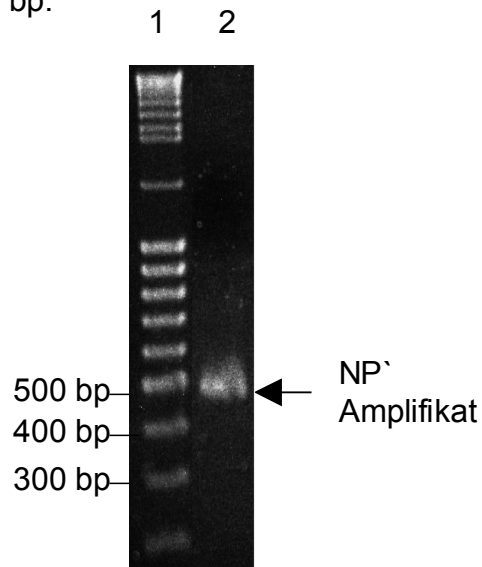
Auf dem RNA-Segment, welches für das Nukleoprotein kodiert, konnte ein weiterer offener Leserahmen identifiziert werden. Die Sequenz wurde von uns als NP' bezeichnet. Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen den Versuch NP' zu exprimieren und im weiteren das Protein für serologische Tests aufzubereiten. Die Versuche verlaufen in Analogie zu den Versuchen mit N1'.

### 5.6.1 Amplifikation von NP'

Zunächst wurde bei NP' eine RT-Polymerase-Kettenreaktion mit geeigneten Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei enthielt der Vorwärts-Primer (pGex-6P-1NP' XhoIhin) eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease XhoI und der Rückwärts-Primer (pGex-6P-1NP' BamHIrück) für BamHI. Nach erfolgreicher Amplifikation wurde zur Bestätigung eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt, durch die die errechnete Größe des Fragments von 462 bp

bestätigt werden konnte.

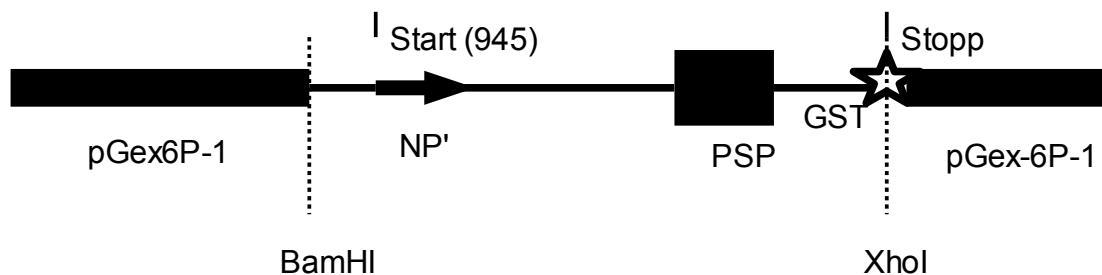
Abb. 29 zeigt in der 2. Spur die Amplifikation von NP' und bestätigt die errechnete Größe von 462 bp.



**Abb. 29: Kontrolle der Amplifikation von NP' mittels Agarosegel-Elektrophorese**  
Darstellung des NP' nach Amplifikation (Spur 2, 462 bp). DNA Ladder Mix in Spur 1

### 5.6.2 Subklonierung von NP' in den Expressionsvektor pGex-6P-1

Nach Verdau des Vektors und des NP'-Amplifikats wurden die Fragmente in den Expressionsvektor pGex-6P-1 ligiert und in E.coli transformiert.



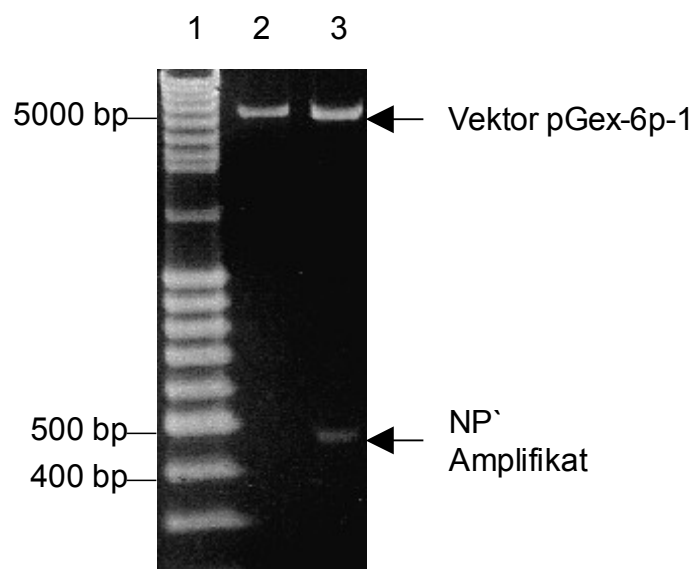
**Abb. 30: Schematische Darstellung des pGex-6P-NP' Konstruktes**

### 5.6.3 Transformation in E.coli und Überprüfung des pGex-6P-1 Konstruktes

Der nächste Schritt war die Transformation des pGex-6P-1-NP' Konstrukts in einen E.coli Stamm, um anschließend NP' zu exprimieren.

Wie schon bei der Transformation von N1' erklärt, wurde der Ligationsansatz des NP'-pGex-6P-1-Konstrukts in E.coli DH5 $\alpha$  transformiert und anschließend im LB-Medium inkubiert. Nach üN Expression wurde eine Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab durchgeführt. Anschließend wurde das Insert mittels Restriktionsverdau mit XhoI und BamHI aus dem Vektor geschnitten und durch eine Agarosegel-Elektrophorese ausgewertet. Die erwarteten DNA-Fragmente von 462 bp (NP') und 4984 bp (pGex-6P-1 Vektor) konnten nachgewiesen werden.

In Spur 3 der Abb. 31 ist sowohl der Vektor pGex-6P-1 als auch NP' zu erkennen. Dies spricht für eine erfolgreiche Klonierung von NP' in den Vektor und auch für eine erfolgreiche Transformation des Konstrukts in E.coli. Spur 2 zeigt eine nicht erfolgreiche Klonierung, da hier die Bande für NP' fehlt.



**Abb. 31: Agarosegel-Elektrophorese nach Transformation des Vektor-Konstrukts in E.coli**  
In den Spuren 2 und 3 laufen Plasmid-Präparationen von unterschiedlichen E. coli Klonen. In Spur 3 erkennt man neben dem Vektor auch das NP' Amplifikat (Bande bei 462 bp). Dies spricht für eine erfolgreiche Insertion. DNA Ladder Mix in Spur 1

#### 5.6.4 Sequenzierung des NP'-pGex-6P-1 Konstrukts

Für die Sequenzierung musste eine Plasmid-Präparation im großen Maßstab durchgeführt werden. Die Oligonukleotide pGex-6P-1NP' XhoIhin und pGex-6P-1NP' BamHIRück wurden für die Sequenzierung verwendet. Der Primer pGex-6P-1NP' XhoIhin band in 5'Richtung von der Polylinkerregion, der Primer pGex-6P-1NP' BamHIRück in 3'Richtung. Zur Auswertung der Sequenzierung wurde

das Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources verwendet. Die Übereinstimmung mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz von Influenza ergab einen Wert von 99%. Damit konnte gezeigt werden, dass es während der Amplifikation, Klonierung und Transformation nicht zu größeren Mutationen im NP'-Konstrukt gekommen war.

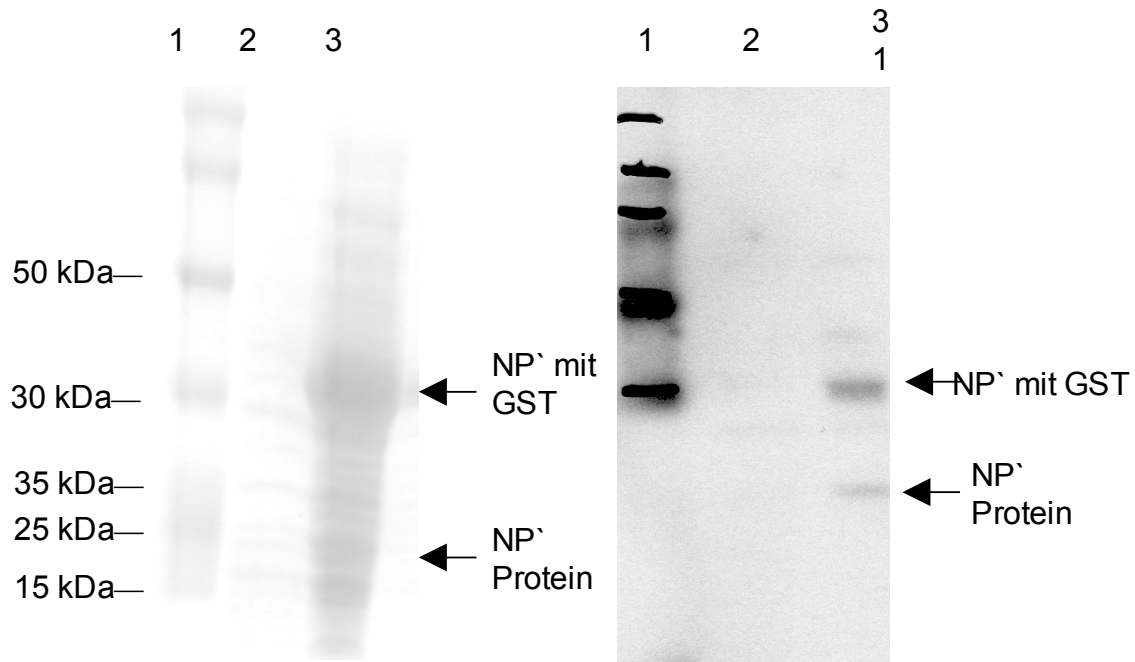
## **5.7 Expression und Aufreinigung von NP'**

### **5.7.1 Expression von NP'**

Die Expression von NP' erfolgte in gleicher Weise wie bei N1'. Die Expression von NP' wurde durch IPTG-Induktion der mit dem rekombinanten Vektor pGex-6P-1 transformierten Bakterienzellen erreicht.

Transformierte *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden  $\bar{u}N$  angezüchtet und 1 ml der  $\bar{u}N$ -Kultur für die Beimpfung von 100 ml eines mit Ampicillin versetzten LB-Mediums verwendet, welches anschließend bis zu einer  $OD_{595\text{ nm}} = 0,6$  bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert wurde. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zusatz von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM, nachdem Kontrollproben entnommen worden waren. Nach IPTG-Zusatz wurde die Kultur für weitere 5 Stunden auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Vor der weiteren Verarbeitung der Bakterienzellen wurden noch einmal Kontrollproben entnommen, die nach elektrophoretischer Auftrennung untersucht wurden. Das Coomassie-gefärbte Gel bzw. der Immunoblot bestätigte die Expression von NP'.

Abb. 32 zeigt in der 2. Spur des Coomassie-gefärbten Gels und im Immunoblot jeweils die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. Hier ist jeweils nur eine schwache Bande bei ca. 17 kDa zu erkennen. Spur 3 zeigt die Probe nach Induktion der Proteinbiosynthese. Nun ist eine deutlich stärker ausgeprägte Bande bei 17 kDa zu erkennen, was für eine Expression des Proteinproduktes von NP' spricht. Zusätzlich ist eine Bande bei ca. 40 kDa zu erkennen, welche das Fusionsprotein NP' mit GST darstellt.



**Abb. 32: Aufreinigung von NP' nach Expression in E. coli sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch im Immunoblot**

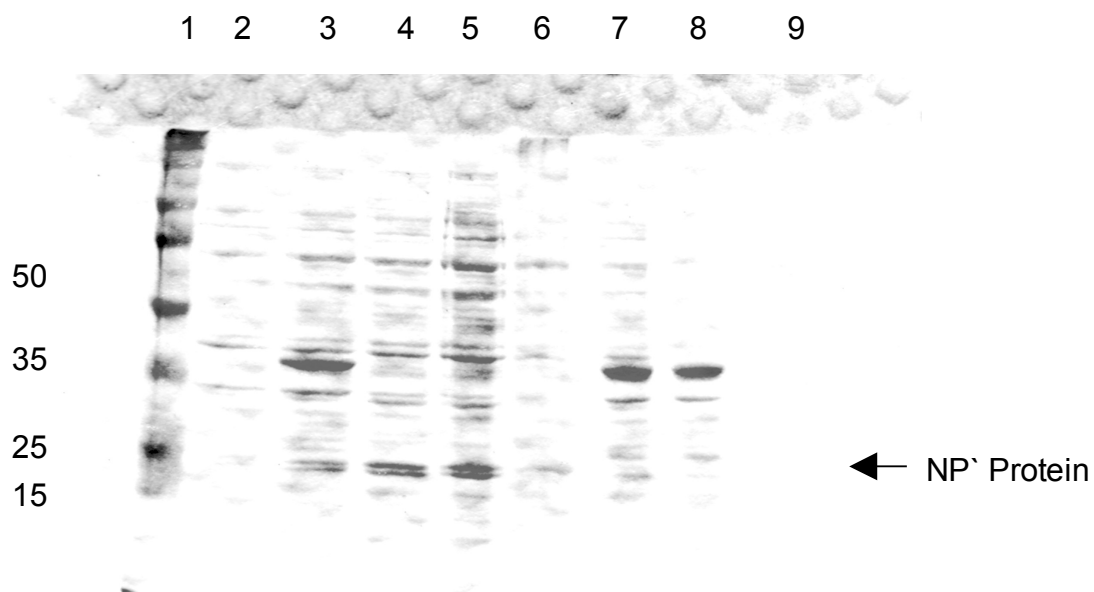
In Spur 2 läuft die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. In Spur 3 sieht man die Probe nach IPTG-induzierter Proteinbiosynthese. Rainbow Marker RPN 800 in Spur 1

### 5.7.2 Aufreinigung von NP'

Wiederum wurden drei Ansätze, jeweils 1000 ml eines mit den entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Mediums mit 5 ml einer frischen üN.-Kultur des jeweiligen NP'-Klons beimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer  $OD_{595\text{ nm}} = 0,6$  inkubiert, anschließend mittels IPTG induziert und weitere 5 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Jeweils einer dieser drei Ansätze wurde mittels Glutathion-Sepharose 4B, mit Ultraschall oder mit Glu-HCL aufgereinigt. Die Überprüfung der Aufreinigung wurde durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung und zum anderen durch einen Immunoblot durchgeführt.

Abb. 33 zeigt das Coomassie-gefärbte Gel der 3 verschiedenen Aufreinigungsprotokolle. Spur 2 ist die Kontrolle vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG und Spur 3 die Kontrolle nach Induktion. Spur 4 zeigt den Überstand und Spur 7 das Pellet nach Ultraschallauftrennung. Spur 5 zeigt den Überstand und Spur 8 das Pellet nach dem Aufreinigungsversuch mittels Glutathion-Sepharose 4B. In Spur 6 läuft der Überstand nach Aufreinigung mit GuHCL und in Spur 9 das Pellet. Insgesamt zeigen fast alle

Spuren eine zweite dicke Bande im Bereich von 40 kDa, was NP' mit GST entspricht. Desweiteren sind in allen Spuren noch sehr viele weitere Banden erkennbar, was dafür spricht, dass die Aufreinigung nicht sehr effektiv war. Es konnte das Protein von NP' nicht isoliert werden. Dieses ist aber für die weiteren Arbeiten essentiell. Daher wurde NP' von uns in einen anderen Expressionsvektor umkloniert, um so gegebenenfalls eine bessere Aufreinigung zu erreichen.



**Abb. 33: Aufreinigung des NP' Proteinproduktes nach verschiedenen Protokollen und anschließender Kontrolle im Coomassie-Gel**

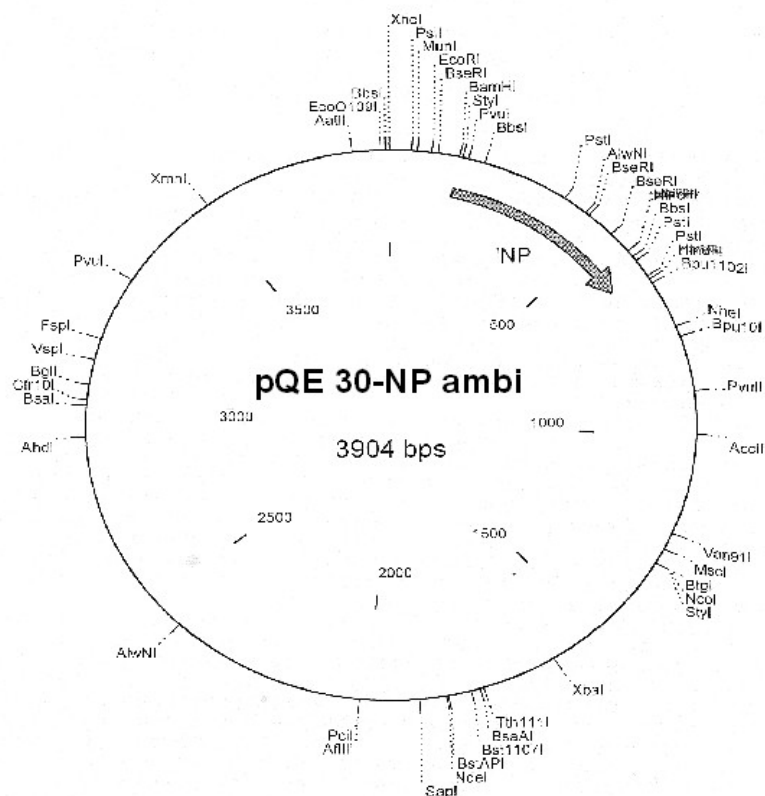
In Spur 2 läuft die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. In Spur 3 sieht man die Probe nach IPTG-induzierter Proteinbiosynthese. Die Spuren 4-9 zeigen die Ergebnisse mehrerer Aufreinigungsprotokolle. Rainbow Marker RPN 800 in Spur 1

### 5.8 Umklonierung von NP' aus pGex-6P-1 Konstrukt in den Expressionsvektor pQE 30

Auch bei dem pGex-6P-1-NP' Konstrukt konnte eine Isolierung von NP' nicht erreicht werden. Es gab nach allen Aufreinigungsversuchen noch sehr viele unspezifische Banden in den Kontrollgelen. Dabei handelte es sich vermutlich um Proteine von E.coli. Daher klonierten wir NP' in den Expressionsvektor pQE 30 um, in der Hoffnung, dass der His-Tag, der vor dem eigentlichen Proteinprodukt synthetisiert wird, eine Isolierung von NP' zulassen würde.

Das Konstrukt pGex-6P-1-NP' wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI verdaut. Anschließend wurde eine Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt und das Insert NP' aus dem Gel geschnitten und wieder extrahiert. Der nächste Schritt war ein Verdau des Vektors pQE 30 mit BamHI und Sall. Eine neuerliche Amplifikation mittels PCR und neuen Primern war nicht notwendig, da die entstanden Enden genau ineinander passten und neue Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und Sall entstanden. Nach Insertion von NP' in pQE 30 stand das neue Konstrukt zur Verfügung.

**Abb. 34: Vektorbild von pQE-30 nach Insertion von NP'**  
Zudem erkennt man die möglichen Restriktionsschnittstellen des Vektors. Bei unserem Konstrukt wurden BamHI und Sall als Restriktionsendonukleasen verwendet





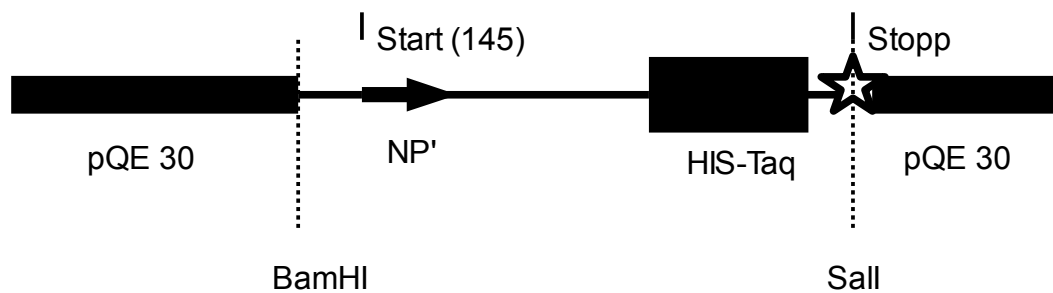


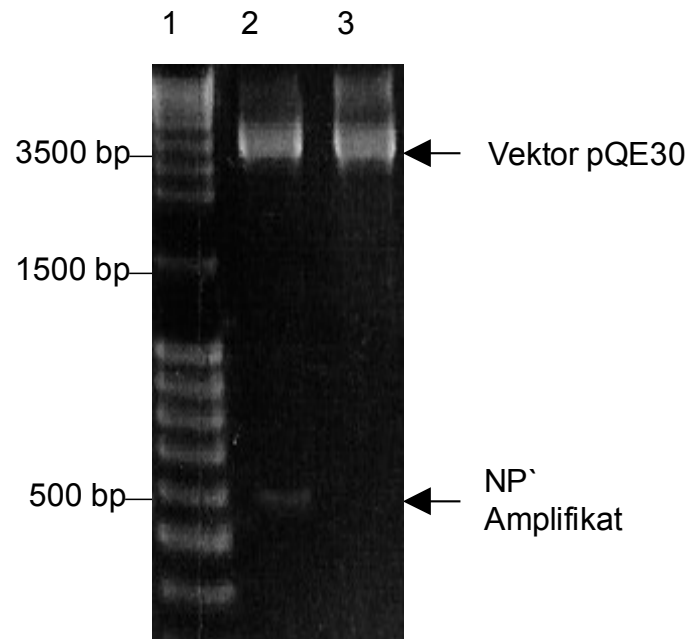
Abb. 35: Schematische Darstellung des pQE 30-NP' Konstruktes

### 5.8.2 Transformation in E.coli und Überprüfung des pQE 30 Konstrukts

Es wurden die gleichen Techniken wie bei den entsprechenden Arbeiten am pGex – 6P – 1 Konstrukts angewendet (s. 5.6.3). In Analogie zu N1' wurde auch hier der E. coli Stamm M15 pREP 4 eingesetzt. Dieser bot den Vorteil, dass bei positiver Transformation des pQE 30 Vektors eine zusätzliche Kanamycin-Resistenz entstand, die eine Selektion der E.coli Klone mit enthaltenem pQE 30 Vektor vereinfachte. Hierfür musste den Agarplatten neben Ampicillin auch Kanamycin zugesetzt werden.

Zur Überprüfung des Konstruktes wurde eine Plasmid – Präparation im kleinen Maßstab mit anschließender Restriktion mit BamHI und Sall durchgeführt. Diese wurde mit Hilfe einer Agarosegel – Elektrophorese ausgewertet.

Abb. 36 zeigt in Spur 2 eine erfolgreiche Umklonierung und Transformation. Es ist sowohl eine Bande für den Vektor pQE 30 (3500 bp) als auch eine Bande für NP' (462 bp) zu erkennen. Spur 3 zeigt eine missglückte Umklonierung, da zwar die Bande des Vektor, aber nicht die von NP' zu sehen ist.



**Abb. 36: Kontrolle der Umklonierung von NP' aus pGex-6P-1 in pQE-30, anschließender Plasmid-Präparation und Restriktion mit BamHI und Sall im Agarosegel**

In den Spuren 2 und 3 laufen Plasmid-Präparationen von unterschiedlichen *E. coli* Klonen. In Spur 2 erkennt man neben dem Vektor auch das NP' Amplifikat (Spur bei 462 bp). Dies spricht für eine erfolgreiche Insertion. DNA Ladder Mix in Spur 1

### 5.8.3 Sequenzierung des pQE 30 Konstrukts

Zur Sequenzierung des pQE 30 Konstruktes wurde eine Plasmid-Präparation im großen Maßstab durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Programms *Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources* (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Die Übereinstimmung mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz von Influenza ergab einen Wert von 99%. Damit konnte gezeigt werden, dass es während der Umklonierung und Transformation nicht zu größeren Mutationen im NP'-Konstrukt gekommen war.

### 5.9 Expression und Aufreinigung des NP' aus dem pQE 30 Konstrukts

### 5.9.1 Expression des NP' aus dem pQE 30 Konstruktes

Die Expression erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei den anderen Expressionen bis auf den Zusatz von Kanamycin, der aufgrund des Einsatzes des pQE 30 Vektors notwendig wurde (s. 5.7.1)

### 5.9.2 Aufreinigung des NP'

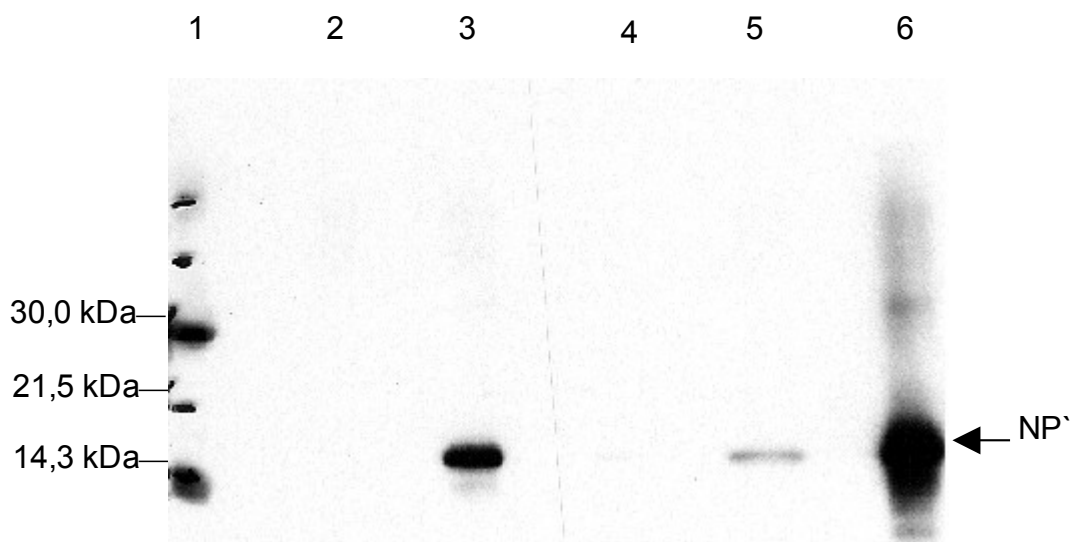
Wie bereits bei N1' beschrieben, wurde versucht, NP' zuerst mittels Bindung an Ni-NTA-Harz und anschließender Elution zu reinigen. Ein weiterer Ansatz war die Resuspension in 8M Urea mit anschließender Reinigung mittels FPLC.

Die Reinigung des Proteins erfolgte mit Hilfe von Ni-NTA-Harz befüllten Polypropylensäulen (Bettvolumen: 2 ml). Die Beladungs- sowie die Elutionsflußgeschwindigkeit wurde durch die Säulen selbst limitiert; sie entsprach etwa 10 – 15 ml/h. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mittels eines Imidazolgradienten. Während der Reinigung wurde vor und nach jedem Schritt eine Probe zur späteren Auswertung mittels Coomassie-gefärbtem Agarosegel asserviert. Dieses zeigte, dass trotz der Möglichkeit einer spezifischen Aufreinigung mittels Bindung des His-Tags an den Ni-NTA-Harz, keine suffiziente Reinigung des NP'-Proteins möglich war. Auf dem gefärbtem Gel waren noch etliche Banden erkennbar, die nicht spezifisch für NP' waren. Daher wurde die Methode der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Harz verlassen und es wurde nun versucht, die Bakterien mit Hilfe von 8 M Urea und anschließendem Ultraschall aufzuschließen und anschließend mittels FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography). Hierfür wurden die Bakterien nach Expression und Zentrifugation nicht mehr in PBS resuspendiert, sondern in 8 M Harnstoff. Dieses Gemisch wurde dann solange mit Ultraschall behandelt, bis die Suspension klar und durchscheinend wurde. In dem durchgeführten Kontroll-Gel konnte NP' als Bande bei ca. 17 kDa nachgewiesen werden (s. Abb. 37). Es zeigte sich, dass es nicht möglich war, NP' komplett in Lösung zu bringen. Ein großer Teil des Proteins fiel aus und blieb im Pellet zurück (s. Abb. 37 Spur 6). Anschließend wurde der Überstand mittels FPLC gereinigt. Hierfür wurde eine Chromatographie-Säule mit dem Überstand befüllt und dann mittels

spezifischer Gradienten versucht, eine Reinigung zu erzielen. Es wurde jeweils das Eluat in 1ml Schritten aufgefangen. Die Überprüfung der Aufreinigung geschah zum einen durch die SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassie – Färbung und zum anderen durch Immunoblot.

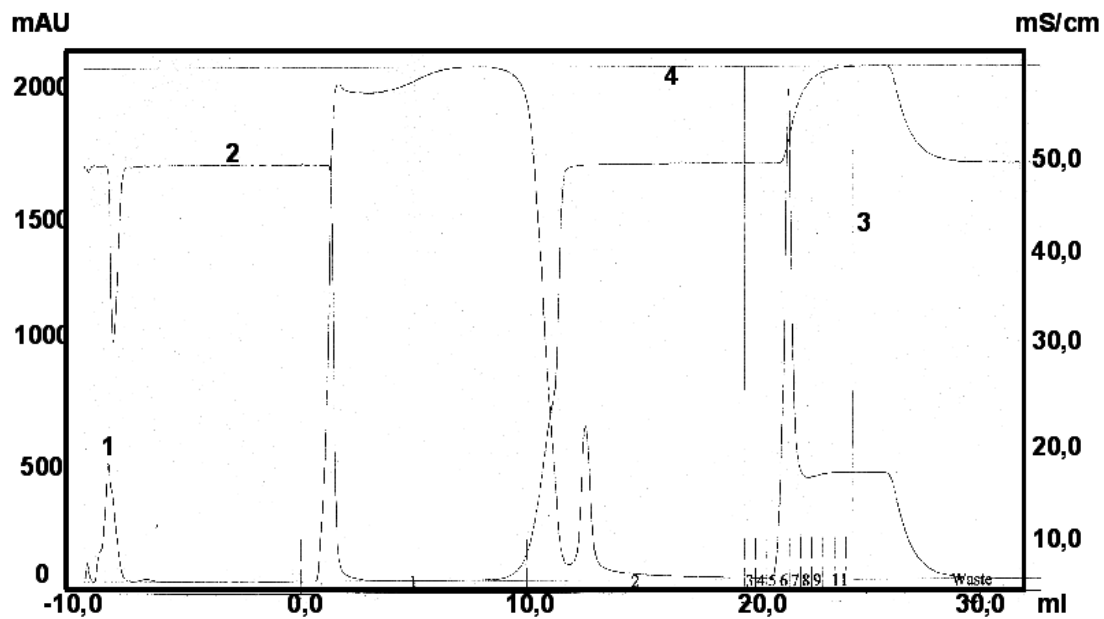
Abb. 39 zeigt den Immunoblot nach FPLC. Hier zeigt sich deutlich eine Bande bei ca. 17kDa in den Spuren 6 und 7, welche NP' entspricht. Da es sich aber um einen Antikörper gegen den His-Tag handelt, wird nur das Proteinprodukt von NP' dargestellt. In dieser Abbildung lässt sich nichts über die Güte der Aufreinigung sagen. Daher wurde auch noch ein Gel mit dem gleichen Versuchsaufbau mit Coomassie gefärbt. Hier zeigen sich neben der Bande für NP' noch sehr viele andere Banden, die nicht spezifisch für NP' sind (s. Abb. 40).

Daher mussten wir feststellen, dass auch eine Isolierung von NP' nicht möglich war. Wir stellten daraufhin die Arbeiten an NP' ein, da eine Isolierung des Proteins für alle weiter geplanten serologischen Arbeiten essentiell gewesen wäre.



**Abb. 37: Aufreinigung des Proteinproduktes von NP' mit 8 M Harnstoff im Immunoblot unter Verwendung eines Antikörpers gegen den HIS-Tag**

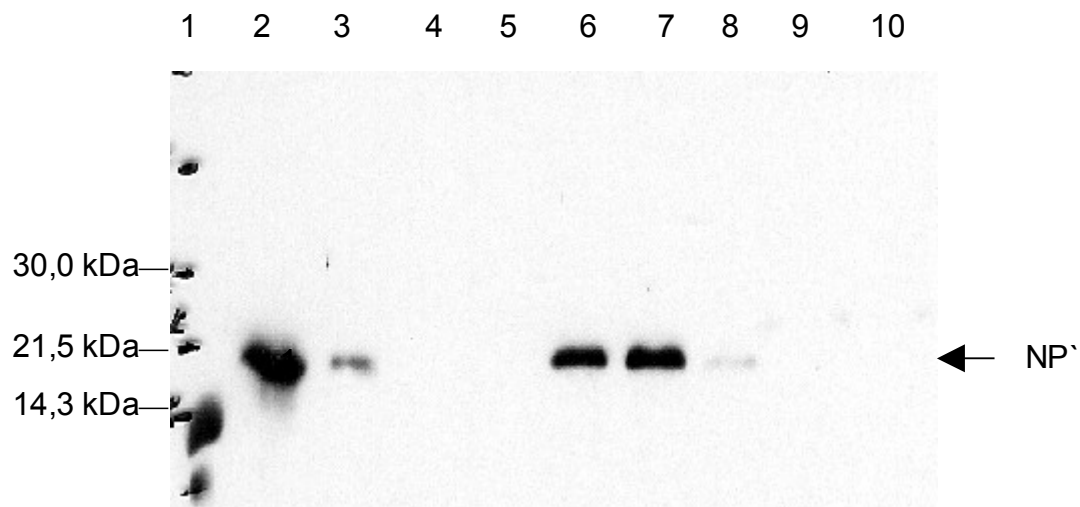
In Spur 2 läuft die Probe vor Induktion der Proteinbiosynthese mittels IPTG. In Spur 3 sieht man die Probe nach IPTG-induzierter Proteinbiosynthese. Spur 4 zeigt 1 µl des Überstands nach Behandlung mit 8M Urea, Spur 5 10 µl des Überstands und Spur 6 das Pellet nach 8M Urea und anschließender Zentrifugation. Rainbow Marker RPN 755 in Spur 1



**Abb. 38: Flussdiagramm der Aufreinigung von NP' mittels FPLC**

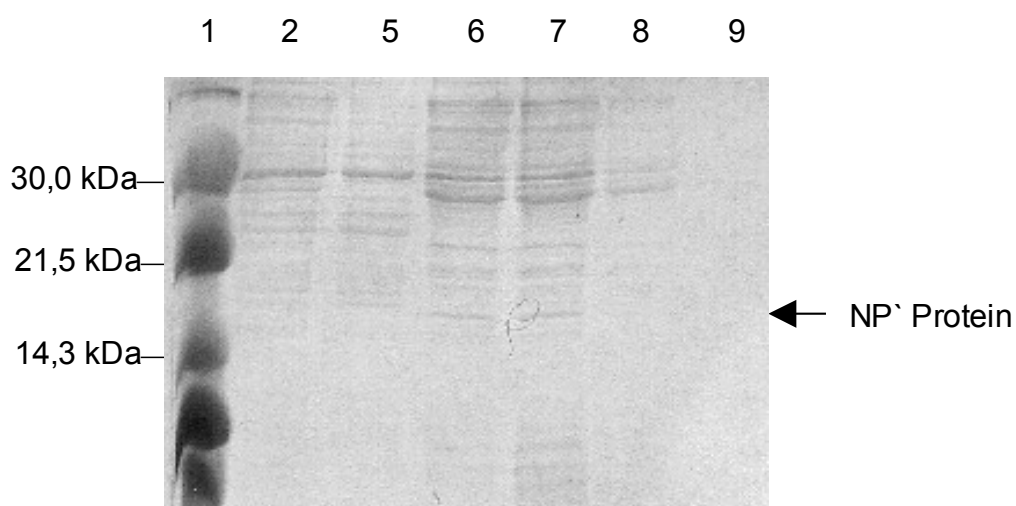
1: HiTrap Chealting UV, 2: HiTrap Chealting Cond, 3: HiTrap Chealting Conc, 4: HiTrap Chealting Flow, 1-11: gesammelte Fraktionen

Das Diagramm zeigt die Aufreinigung und die gesammelten Fraktionen des aufgereinigten NP'. Anschließend wurden die Fraktionen mittels Coomassie-Gel und Immunoblot ausgewertet.



**Abb. 39: Immunoblot der Aufreinigung von NP' mit FPLC**

In Spur 2 läuft der Überstand der NP'-Expression vor FPLC. Die Spuren 3-10 bezeichnen jeweils die gesammelte Fraktion nach FPLC, wobei die Spurangabe gleich der Nummer der Fraktion ist (vergl. Abb. 34). Rainbow Marker RPN 755 in Spur 1; 1. Antikörper: Anti RGS-His, 2. Antikörper: Anti-Maus



**Abb. 40: SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung der Aufreinigung von NP' mit FPLC**

In Spur 2 läuft der Überstand der NP'-Expression vor FPLC. Die Spuren 3-10 bezeichnen jeweils die gesammelte Fraktion nach FPLC, wobei die Spurangabe gleich der Nummer der Fraktion ist (vergl. Abb. 34). Rainbow Marker RPN 755 in Spur 1

Es gelang zwei potentielle alternative offene Leserahmen (ORF) auf dem Segment der Neuraminidase und dem Segment der Nukleoproteine zu deduzieren. Diese konnten auch in entsprechende Transfusionsvektoren kloniert werden. Dies konnte durch entsprechende Plasmid-Präparationen bestätigt werden. Um die angestrebten immunochemischen Versuche, und damit einen allgemein anwendbaren Influenza A Nachweis auf Basis immunkompetenter Peptid-Epitope zu etablieren, wäre die Isolierung der Peptide notwendig gewesen. Dies gelang trotz verschiedenster Aufreinigungsprotokolle und Umklonierung in andere Vektoren nicht. Daher wurde schließlich der Ansatz verlassen.

Aufgrund der Probleme bei der Aufreinigung der Peptide wurde dieser Ansatz verlassen und der zweite Teil der Arbeit begonnen. Dieser Ansatz erschien uns aussichtsreicher, um einen neuen, allgemeinen Influenza A Nachweis zu etablieren.

### **5.10 Influenza Diagnostik aus Saliva-Proben**

Da eine akute Infektion der Atemwege durch viele verschiedene Erreger ausgelöst werden kann und die Klinik viraler Infektionen unterschiedlicher Genese ähnlich verlaufen kann, ist eine schnelle und sichere klinische Diagnose in vielen Fällen schwierig. Der aktuelle diagnostische Goldstandard ist die Virusisolation in Hühnereiern und/oder MDCK Zelllinien und als Probenmaterial wird Sputum, Bronchiallavage oder ein Nasen-/Rachenabstrich genutzt.

Während einer Influenzasaison haben vor allem Neugeborene und Kleinkinder ein erhöhtes Risiko für eine Influenzainfektion und einer Hospitalisation aufgrund einer Infektion [Izurieta et al., 2000]. Aber gerade bei dieser Patientengruppe kann es wegen geringer Compliance zu Schwierigkeiten bei der Probengewinnung kommen.

Auch wenn Saliva und Sputum nicht als bestes Material ersetzen kann, so stellt es doch eine Alternative für Kleinkinder und epidemiologische Studien dar. Um das Probenmaterial zu etablieren bedarf es allerdings im Vorhinein der Klärung, ob Influenza-RNA in Saliva stabil ist und es keine Substanzen gibt, die die RNA spalten und ob es Substanzen gibt, die mit der RT-PCR interagieren [Ochert et al., 1994].

#### **5.10.1 Stabilitäts- und Interaktionsprüfung von Influenza-RNA in Saliva**

Zuerst wurde eine 10 fache Verdünnungsreihe von Influenza Viren A/HK-WSN (H3N1; Anfangskonzentration  $2 \times 10^6$  PFU/ml) oder A/WSN/33 (H1N1; Anfangskonzentration  $2 \times 10^6$  PFU/ml) mit 1,5 ml Saliva angelegt. Aus jeder

dieser Verdünnungen wurde aus 200 µl die RNA mittels Qiagen-RNAEasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Unter der Verwendung des Titan RT-PCR Systems (Roche, Mannheim, Deutschland) und dem PCR-Protokoll nach Stockton et. al. war der zuverlässige Nachweis einer oder mehr PFU des Influenza-Virus (H3N1 oder H1N1) möglich. Ferner konnten wir Nukleinsäure noch zwei Verdünnungsschritte unterhalb der letzten Verdünnung, welche noch ein positives Resultat lieferte, nachweisen. Dies gelang sowohl 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Es konnte kein Abfall der Nachweisgrenze für das verdünnte Virus auch nach 120 Stunden Inkubation festgestellt werden.

Bei zwanzig Saliva Proben von verschiedenen Probanden wurden zwei Verdünnungen unterhalb der letzten, bei der ein positives Ergebnis nachgewiesen werden konnte, angelegt. Nach Extraktion und PCR konnten keine inhibitorischen Effekte bei diesen zwanzig Proben beobachtet werden. Daher sahen wir Saliva als geeignetes Probematerial zur Influenza-Diagnostik an.

#### **5.10.2 Bestimmung der diagnostischen Sensitivität der RT-PCR mit Saliva als Probenmaterial**

Insgesamt wurden 57 Salivaproben von Probanden (Alter zwischen 1 und 57 Jahren), die durch den FLU A/B Rapid Assay (Roche, Mannheim, Deutschland) mit Rachenabstrich als Probenmaterial positiv auf eine Influenzainfektion getestet wurden waren, abgenommen. Zusätzlich wurden noch 23 Proben von gesunden Probanden gewonnen. Alle Proben wurden in 5 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und in speziellen Transportröhrchen verschickt. Die Proben hatten eine Transportzeit von drei bis fünf Tagen bei Raumtemperatur.

Von jeder Probe wurde aus 200 µl die RNA mittels Qiagen-RNAEasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) eine RT-PCR, nach Protokoll von Stockton et al., 1998, durchgeführt. Zur Kontrolle der Ergebnisse und Subtypisierung des Influenza-Virus wurde die Nested-PCR [J. Stockton et al., 1998] unter Verwendung des Taq PCR Core Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt.



Bei 32 Proben (56%) wurde Influenza nachgewiesen (siehe Tabelle 9). 25 von den positiven Nachweisen wurden als Influenza A und 7 als Influenza B typisiert. Bei den Proben der gesunden Probanden wurde kein Virus nachgewiesen.

			Saliva RT-PCR	
			Positiv	Negativ
FLU A/B Rapid Assay (Roche)	Positiv	57	32	25
	Negativ	23	0	23

**Tab. 9: Ergebnisse der Saliva-Untersuchungen**

Es ergab sich für die Saliva PCR eine Sensitivität von 56% und eine Spezifität von 100%.

### 5.10.3 Kultivierung von Influenza-Virus aus Saliva

Eine Kultivierung von Influenza-Viren aus Saliva war nicht möglich. Wahrscheinlich deshalb, weil es in Saliva Substanzen gibt, die effizient vor bakteriellen und viralen Infektionen schützen [Wu et al., 1994] und zum anderen, weil es sich bei Saliva nicht um steriles Probenmaterial handelt.

## 6 Diskussion

Diese Arbeit verfolgte zwei Fragestellungen. Die erste beschäftigte sich mit zwei Sequenzenabschnitten des Genoms des Influenza-Virus, die in einem alternativen Leserahmen sowohl ein Start- als auch ein Stopp-Codon aufweisen. Es sollte überprüft werden, ob diese Sequenzen zur Bildung von Antikörpern im Infizierten führen.

Hierfür wurden die Sequenzenabschnitte zunächst mittels PCR aus dem Genom des Influenza-Virus amplifiziert. Anschließend wurde das Amplifikat in einen bakteriellen Expressions-Vektor kloniert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Transformation des Konstruktes in entsprechende E. coli Stämme, um eine ausreichende Expression des Proteins, für welches die Sequenzen kodieren, zu erreichen. Die Überprüfung der Expression erfolgte durch Immunoblot und SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese mit Coomassie-Färbung. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Expression des entsprechenden Proteins erfolgte. Um die Fragestellung der Arbeit beantworten zu können musste eine Aufreinigung des Proteins erfolgen, Hierfür wurden mehrere Reinigungsprotokolle angewendet.

Trotz der Anwendung verschiedenster Protokolle war es nicht möglich, die Expressionsprodukte der zwei zu untersuchenden Sequenzen in einem ausreichenden Maß zu isolieren. Es war geplant, die aufgereinigten Proteine in Immunoblots einzusetzen, um die Prävalenz von Antikörpern in humanen Seren nachzuweisen. Die Reindarstellung des Proteins konnte mit den gewählten Aufreinigungsprotokollen nicht erzielt werden. Die Proteine waren ferner deutlich unlöslich in wässriger Lösung. Verschieden Extraktionsprotokolle wurden verwendet, um die Menge extrahierten Proteins zu erhöhen. Keine der verwendeten Protokolle führte jedoch zu einer quantitativen Verbesserung. Als mögliche Ursache wurde der Fusionsanteil des Proteins postuliert.

Daher wurde in einem nächsten Schritt ein anderer Expressionsvektor verwendet. Der gewählte Vektor verfügt über keine Fusionsproteinsequenzen. Lediglich ein HIS-Tag wird an die gewünschte Sequenz fusioniert. Gegen die

hierbei fusionierten sechs Histidine ermöglichen eine Affinitätsreinigung des gewünschten Proteins. Ferner können die Antikörper auch zur Darstellung des Proteins im Immunoblot herangezogen werden.

Nach Subklonierung und Überprüfung der Konstrukte erfolgten Aufreinigungen nach verschiedenen Protokollen. Unter anderem wurden Ni-NTA-Harz befüllte Polypropylensäulen für die Affinitätschromatographie verwendet. Auch mittels dieser spezifischen Aufreinigung war eine quantitative Darstellung des Proteins nicht möglich. Auch hier zeigte sich das Protein relativ unlöslich in wässriger Lösung. Da die entsprechenden Proteine in entsprechender Quantität und Reinheit, die für die nachfolgenden Untersuchungen erforderlich sind, nicht dargestellt werden konnten, musste dieser Ansatz aufgegeben werden. Leider konnte auch keine Antikörper gegen diese Proteine in Kaninchen erzeugt werden.

Als Ursache für die unzureichende Expression und Aufreinigung der Proteine kann eine autolytische Aktivität dieser Proteine postuliert werden. Diese Hypothese lässt sich aber nur schwer halten, da keine Abbauprodukte im SDS-Page nachgewiesen werden konnten. Zum anderen konnten Proteine nachgewiesen werden, die ein Vielfaches des theoretischen Molekulargewichts der gewünschten Proteine aufwiesen. Dieses könnte dafür sprechen, dass die Proteine Oligomere bilden, die sowohl die Löslichkeit als auch die Bindung an die Affinitätschromatographischen Matrix beeinflussen können. Dieses könnte die Isolierung des Proteins deutlich erschweren. Eine Untersuchung dieser potentiellen oligomeren Formen war jedoch auf Grund des Fehlens von Antikörpern im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Zusätzlich könnte auch in weiteren Versuchen der Ansatz verfolgt werden, die isolierten ORF in höheren Zellen, wie z.B. Säuger- oder Insektenzellen, zu exprimieren, um so eventuell das Dilemma der schwer aufzureinigenden Proteine zu lösen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte Saliva als mögliches Untersuchungsmaterial zur Influenza-Diagnostik untersucht werden. Den Goldstandard stellt die Virusisolation in Hühnereiern und/oder MDCK Zelllinien oder der Nachweis mittels Reverser Transkription und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dar und als Probenmaterial wird Sputum, Bronchiallavage oder ein Nasen-/Rachenabstrich genutzt.

Hierfür wurde zunächst überprüft, ob Influenza-Viren in Saliva stabil sind und ob in Saliva Substanzen enthalten sind, die zu einer Inhibition der anschließenden Untersuchungen führen könnten. Hierfür wurden mehrere Verdünnungsreihen von Saliva, welche mit unterschiedlichen Influenzastämmen versetzt wurden, angelegt. Zusätzlich wurden diese Verdünnungsreihen bis zu 120 Stunden in Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein Virusnachweis mittels RT-PCR durchgeführt. Hierbei konnte kein Abfall der Nachweisgrenze für das verdünnte Virus auch nach 120 Stunden Inkubation festgestellt werden. Von dieser Beobachtung war auszugehen, da die Hülle der Viren und die Verpackung der RNA als guter Schutz gegen Umweltfaktoren bekannt sind. Saliva-Probe konnten somit als geeignetes Material zur RT-PCR basierten Influenza-Diagnostik angesehen werden.

Im nächsten Schritt wurden uns von niedergelassenen Ärzte insgesamt 57 Salivaproben von Patienten geschickt, bei denen im Rachenabstrich mittels Influenzaschnelltest eine Influenza-Erkrankung nachgewiesen wurde. Die Salivaproben wurden von uns mittels RT-PCR auf Influenza-Virus untersucht. Zusätzlich wurden noch 20 Salivaproben von gesunden Mitarbeitern aus unserem Labor als Negativkontrolle untersucht.

Bei 32 Proben konnten Influenzaviren nachgewiesen werden. Bei allen 20 Kontrollen konnte kein Virus nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 56% und einer Spezifität von 100%.

Die Zahlen zeigen, dass Saliva als Probenmaterial den Rachenabstrich nicht ersetzen kann. Allerdings kann Saliva durchaus eine Alternative darstellen, wenn es z.B. aufgrund einer eingeschränkten Compliance (z.B. Kleinkinder) nicht möglich ist, einen Rachenabstrich durchzuführen. Auch für epidemiologische Untersuchungen, wo die Gewinnung eines Rachenabstriches bei einer Vielzahl von Patienten sehr zeitaufwendig ist, kann Saliva eine Alternative darstellen.

Eine Kultivierung von Influenza-Viren aus Saliva war nicht möglich. Wahrscheinlich deshalb, weil es in Saliva Substanzen gibt, die effizient vor bakteriellen und viralen Infektionen schützen [Wu et al., 1994] und zum anderen, weil es sich bei Saliva nicht um steriles Probenmaterial handelt.

## 7 Zusammenfassung

Das Influenza-Virus stellt weiterhin eine große Gefahr für die Gesundheit der Menschen dar. In regelmäßigen Abständen kommt es zu Pandemien, die durch das Virus ausgelöst werden. Hierbei kann es zu Tausenden von Todesopfern kommen. Erschwert wird die Therapie, die Diagnostik und auch die Prophylaxe mittels Impfung durch die hohe Variabilität des Virus. Durch einen Antigen shift kann es zur Entwicklung eines Virusstamms kommen, gegen den eine Impfung nicht wirksam ist. Durch den Antigen shift kam es z.B. auch zur Entstehung der spanischen Grippe mit Millionen von Todesopfern.

Dies macht die weitere Erforschung des Virus und die Verbesserung der Diagnostik und Prophylaxe notwendig.

Diese Arbeit untersuchte im ersten Abschnitt zwei potentielle Proteine, die an Hand der Primärsequenz des Influenzavirusgenoms als alternativen Leserahmens deduziert werden konnten. Die Expressionsprodukte dieser offenen Leserahmen (ORF) wurden noch nicht beschrieben. Zur Untersuchung der putativen Expressionprodukte wurden die kodierenden Sequenzen zunächst mittels PCR isoliert und anschliessend in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert. Die aus diesem Vektor exprimierten Proteine sollten zur Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen diese Proteine in humanen Seren verwendet werden. Ferner sollten diese Proteine zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet werden. Die exprimierten Proteine mussten für diese Zwecke isoliert und in reiner Form dargestellt werden. Trotz der Anwendung verschiedener Aufreinigungsprotokolle und Expressionsvektoren konnten die Proteine zwar exprimiert aber nicht in ausreichender Menge und Reinheitsgrad dargestellt werden um weitere Untersuchungen durchzuführen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Saliva als mögliches Material zur Influenza-Diagnostik. Saliva bietet den Vorteil einer einfacheren Gewinnung im Vergleich zu einem Rachenabstrich.

Zunächst wurde die Stabilität von Influenzaviren in Saliva untersucht. Wir

konnten zeigen, dass auch nach 120 Stunden noch Influenza-Virus-RNA ohne Reduktion der Nachweisgrenze in Saliva nachweisbar ist.

In einem nächsten Schritt wurde die Sensitivität und Spezifität ermittelt. Hierfür wurden 57 Proben von Patienten, bei denen im Rachenabstrich durch einen Influenzaschnelltest eine Infektion nachgewiesen wurde, mittels RT-PCR untersucht. Zusätzlich wurden 20 Proben von gesunden Probanden untersucht. Es ergab sich eine Sensitivität von 56% und eine Spezifität von 100%.

Saliva kann sicherlich nicht den Rachenabstrich als Untersuchungsmaterial ablösen, aber z.B. im Rahmen von epidemiologischen Untersuchungen oder bei fehlender Compliance für einen Rachenabstrich stellt Saliva eine Alternative dar.

## 8 Literaturverzeichnis

- Bova I.Y., Bornstein N.M., Korczyn A.D. (1996). Acute infection as a risk faktor for ischemic stroe. *Stroke* 27, 2204-2206
- Brady M.T. (1998). Influenza virus infections in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 9, 92-102
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M. T. und Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter based transcription-translation system for theanalysis of proteins in vivo and in vitro. *Methods Enzymol.* 155, 416-433
- Centers for Disease Control and Prevention: 2009 H1N1 Flu: International Situation Update. (abgerufen 3.09.2009)
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7, 1306-1312
- Diepersloot R.J., Bouter K.P., van Beek R., Lucas C.J., Masurel N., Erkelens D.W. (1989). Cytotoxic T-cell response to influenza A subunit vaccine in patients with type 1 diabetes mellitus. *Neth J Med* 35, 68-75
- Duchini A., Vierenes M.E., Nyberg L.M., Hendry R.M., Pockros P.J. (2000). Hepatic decompensation in patients with cirrhosis during infection with influenza A. *Arch Intern Med* 160, 113-115
- Fields, B.N., & Knipe, D.M. (Hrsg.) (1991). *Fundamental Virology*. 2nd edition. Raven Press, New York
- Gallwitz D., Bos E., Stahl H. (1978). Translation of HeLa cell histone messenger RNAs in cell-free protein synthesizing systems from rabbit reticulocytes, HeLa cells, and wheat germ. *Methods Cell Biol.* 19, 197-213
- Garten R.J., Davis C.T. et al. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* , 197-201

- Hirst GK. (1941). Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94, 22
- Izurieta H., Thompson W.W., Kramarz P. (2000). Influenza and rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med* 342, 232-239
- Kaiser L., Wat C., Mills T., Mahoney P., Ward P., Hayden F. (2003). Impact of Oseltamivir Treatment on Influenza-Related Lower Respiratory Tract Complications and Hospitalizations. *Arch Intern Med* , 1667-1672
- Kyhse-Anderson J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple bands: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitro-cellulose. *J Biochem Methods* 10, 203–209
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lange, W. and Vogel, G.E. (2004). *Influenza Klinik, Virologie, Epidemiologie, Therapie und Prophylaxe*. ABW Wissenschaftsverlag 2. Auflage,
- Meier C.R., Jick S.S., Derby L.E., Vasilakis C., Jick H. (1998). Acute respiratory-tract infections and risk of first-time acute myocardial infarction. *Lancet* 351, 1467
- Mullis, K.B., and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350
- Neuzil K.M., Reed G.W., Mitchehl E.F., Simonsen L., Griffin M.R. (1998). Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalizations in pregnant women. *Am J Epidemiol* 148, 1094-1102
- Nichol K.L., Nordin J., Mullooly J., Lask R., Fillbrandt K., Iwane M. (2003). Influenza vaccination and reduction in hospitalizations for cardiac disease and stroke among the elderly. *N Engl J Med* 348, 1322-1332
- Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J. (1998). *Textbook of Influenza*. Blackwell Science, Oxford, London, Edinburgh, Malden, Victoria, Berlin, Paris
- Ochert, A. S., Boulter, A. W., Birnbaum, W., Johnson, N. W. & Teo, C. G. (1994). Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal.



## PCR Methods and Applications 3, 365-368

- Robert-Koch-Institut (2002). Influenza-Ausbruch in einem Altenpflegeheim - Ergebnisse einer retrospektiven Untersuchung. Epidemiol Bull 28, 323-325
- Rohde G., Wiethage A., Borg I., Arinis U., Schuermann A., Loeseke S., Kauth N., Bufe A., Schultze-Werninghaus G. (2001). Influenza A virus in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Abstract, European Respiratory Society Annual Congress, 22.-26. September 2001 ,
- Rott R. (1988). Influenza-Pneumonie: Synergismus von Viren und Bakterien. Die Gelben Hefte 28, 59-68
- Saisonabschlussbericht der Arbeitsgemeinschaft Influenza 2008/2009. [www.influenza.rki.de/agi](http://www.influenza.rki.de/agi)
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory, NY
- Sanger, F., Nicklen S., and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci 74, 5463-5467
- Serum Cross-Reactive Antibody Response to a Novel Influenza A (H1N1) Virus after Vaccination with Seasonal Influenza Vaccine. CDC Morbidity and Mortality Report Weekly , 22.05.2009
- Smith W., Andrewes CH., Laidlaw PP. (1933). A virus obtained from influenza patients. Lancet 2, 66-68
- Sprenger M.J.W., Beyer W.E.P., Kempen B.M., Mulder P.G.H., Masurel N. (1993). Risk factors for influenza mortality? Options for the control of influenza. Excerpta Med. , 15-23
- Stockton J., Ellis J.S., Saville M., Clewley J.P., Zambon M.C. (1998). Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. J Clin Microbiol 36, 2990-2995
- Stüber D., Matile H. and Garotta G. (1990). System for high-level production in Escherichia coli and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis. Immunol Methods 4, 121-152
- Tashiro M., Klenk H.D., Rott R. et al. (1987). Role of Staphylococcus

- protease in the development of influenza pneumonia. *Nature* , 536-537
- Togashi T., Matsuzono Y., Morishima T., Narita M. (2002). Influenza-associated acute encephalopathy in Japanese children. Abstract, 1st European Influenza Congress, Malta, October
  - Togashi T., Matsuzono Y., Morishima T., Yokota S. (2000). Acute encephalitis-encephalopathy during influenza epidemics in Japanese children. Abstract, Options for the Control of Influenza IV, Hersonissos, Crete, September , 23-28
  - Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350–4354
  - Treanor J.J., Hayden F.G., Vrooman P.S. (2000). Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. *JAMA* 283, 1016-1024
  - Vogel G.E., Lange W. (1999). Frühe Chemotherapie einer schweren Influenza A. *Der Bay Int* 19, 230-233
  - White D.O., Fenner F.J. (1994). *Medical Virology*. 4th ed. London: Academic Press
  - WHO: Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir - 2008 influenza season, southern hemisphere. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N1webupdate18072008.pdf> ,
  - Wu A.M., Csako G. and A. Herp. (1994). Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Mol Cell Biochem* 137, 39-55

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenza-Viren .....	1
Abb. 2: Schematische Darstellung des Influenza-Virus Partikels .....	3
Abb. 3: Der Vermehrungszyklus von Influenza-Viren .....	8
Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Influenza .....	10
Abb. 5: Inzidenz der Symptome bei Influenza A (Erwachsene) .....	11
Abb. 6: Nicholson Kriterien.....	20
Abb. 7: Abhängigkeit des Patientenalters auf das Testergebnis.....	22
Abb. 8: Praxisindex und Anzahl der Influenzanachweise in der Saison 2008/09 .....	28
Abb. 9: Positivrate und Praxisindex in der Saison 2008/09.....	29
Abb. 10: EISS- Index in der Saison 2008/09.....	29
Abb. 11: Konsultationsinzidenz in den einzelnen Altersgruppen während der Saison 2008/09.....	30
Abb. 12: Anzahl der ans RKI übermittelten Influenza- Nachweise nach Altersgruppen. Das Balkendiagramm zeigt den Anteil der Influenza A- und B- Meldungen pro Altersgruppe in Prozent.....	31
Abb. 13: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pGEX-6P-1 .....	42
Abb. 14: Schematische Darstellung des prokaryontischen Expressionsvektors pQE.....	43
Abb. 15: Altersverteilung der Studienteilnehmer.....	76
Abb. 16: Amplifikation von N1' mittels Agarosegel-Elektrophorese.....	80
Abb. 17: Vektorbild von pGex-6P-1 nach Insertion von .....	81
Abb. 18: Schematische Darstellung der Klonierung von N1' in pGex-6P-N1 .....	81
Abb. 19: Agarosegel-Elektrophorese nach Transformation des Vektor- Konstrukts in E.coli.....	82
Abb. 20: Expression von N1' in E. coli und Darstellung im Coomassie-gefärbten Gel und im Immunoblot.....	84

Abb. 21: Aufreinigung des N1' Proteinproduktes nach verschiedenen Protokollen und anschließender Kontrolle im Coomassie-Gel.....	85
Abb. 22: Schematische Darstellung des pQE 30-N1' Konstruktes.....	86
Abb. 23: Kontrolle der Klonierung von N1' aus pGex-6P-1 in pQE-30, anschließender Plasmid-Präparation und Restriktion mit SacI und HindIII im Agarosegel.....	87
Abb. 24: Aufreinigung des Proteinproduktes von N1' mit 8 M Harnstoff im SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung.....	89
Abb. 25: Aufreinigung des Proteinproduktes von N1' mit 8 M Harnstoff im Immunoblot unter Verwendung eines Antikörpers gegen den His-Tag.....	89
Abb. 26: Flussdiagramm der Aufreinigung von N1' mittels FPLC.....	90
Abb. 27: Immunoblot der Aufreinigung von N1' mit FPLC.....	90
Abb. 28: SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung der Aufreinigung von N1' mit FPLC.....	91
Abb. 29: Kontrolle der Amplifikation von NP' mittels Agarosegel-Elektrophorese .....	92
Abb. 30: Schematische Darstellung des pGex-6P-NP' Konstruktes.....	92
Abb. 31: Agarosegel-Elektrophorese nach Transformation des Vektor-Konstrukts in E.coli.....	93
Abb. 32: Aufreinigung von NP' nach Expression in E. coli sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch im Immunoblot.....	95
Abb. 33: Aufreinigung des NP' Proteinproduktes nach verschiedenen Protokollen und anschließender Kontrolle im Coomassie-Gel.....	96
Abb. 34: Vektorbild von pQE-30 nach Insertion von NP'.....	97
Abb. 35: Schematische Darstellung des pQE 30-NP' Konstruktes.....	98
Abb. 36: Kontrolle der Umklonierung von NP' aus pGex-6P-1 in pQE-30, anschließender Plasmid-Präparation und Restriktion mit BamHI und Sall im Agarosegel.....	99
Abb. 37: Aufreinigung des Proteinproduktes von NP' mit 8 M Harnstoff im Immunoblot unter Verwendung eines Antikörpers gegen den HIS-Tag.....	101
Abb. 38: Flussdiagramm der Aufreinigung von NP' mittels FPLC.....	102
Abb. 39: Immunoblot der Aufreinigung von NP' mit FPLC.....	102
Abb. 40: SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Färbung der Aufreinigung von NP' mit FPLC.....	103

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Altersverteilung der Übersterblichkeit [Sprenger et al., 1993].....	19
Tab. 2: verschiedene Schnelltests und deren Charakteristika.....	21
Tab. 3: Empfohlene antivirale Medikamente zur Prophylaxe der Influenza.....	26
Tab. 4: Historische Pandemien und Virustyp.....	27
Tab. 5: Verteilung der seit der Saison 1988/89 vom NRZ isolierten bzw. feintypisierten Viren auf die Influenza- Subtypen A(H3N2), A(H1N1), A(H2N1) und den -Typ B .....	32
Tab. 6: Verteilung der gemeldeten Influenzafälle auf die einzelnen Bundesländer, Stand 17.09.2009.....	35
Tab. 7: Verwendete E. coli Stämme.....	44
Tab. 8: Verwendete Oligonukleotide.....	50
Tab. 9: Ergebnisse der Saliva-Untersuchungen.....	106

## 9.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	Akute respiratorische Erkrankung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl (1,1-Dimethylethoxycarbonyl)
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad-Celsius
cDNA	complementary DNA
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
cRNA	complementary RNA
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid x
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EISS	European Influenza Surveillance Scheme
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPLC	Fast-Protein Liquid Chromatography
g	Gramm; Fallbeschleunigung
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HHT	Hämagglutinationshemmtest
HIC	hydrophobic interaction chromatography
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HRV	humanes Rhinovirus Virus
Hz	Hertz
IEX	ion exchange chromatography
Ig	Immunglobulin
IMAC	immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie
IPTG	1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
KBR	Komplementbindungsreaktion
KW	Kalenderwoche
l	Liter
lac	Lactose
Lambda: $\lambda$	Wellenlänge
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LDH	Lactat-Dehydrogenase
m	Meter
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat

---

min	Minute
M	Matrixproteine; Mol
MDCK	Madin Darby canine kidney
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoprotein
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
P	Polymerasekomplex
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFU	Plaque forming Units
PSP	PreScission <sup>TM</sup> Protease
RBS	Ribosomenbindungsstelle
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Revolutions per minute
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
ssRNA	Einzelstrang-RNA
sec	Sekunde
SEC	size exclusion chromatography
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	transformation and storage solution
U	unit

üN	über Nacht
V	Volt
VT	Volumenteile
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewichtprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem

#### 9.4 Abkürzungen der verwendeten Größenordnungen

M	Mega	$10^6$
k	Kilo	$10^3$
d	Dezi	$10^{-1}$
c	Zenti	$10^{-2}$
m	Milli	$10^{-3}$
$\mu$	Mikro	$10^{-6}$
n	Nano	$10^{-9}$
p	Pico	$10^{-12}$

#### 9.5 Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
B	Asx	Asparagin / Asparaginsäure	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	Z	Glx	Glutamin



## 10 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg (in alphabetischer Reihenfolge)

Prof. Dr. Arnold	Prof. Dr. Gotzen	Prof. Dr. Moosdorf
Prof. Dr. Aumüller	Prof. Dr. Griss	Prof. Dr. Mutters
Prof. Dr. Bach	Prof. Dr. Gudermann	Prof. Dr. Neubauer
Prof. Dr. Barth	Prof. Dr. Happle	Prof. Dr. Oertel
Prof. Dr. Dr. Basler	PD Dr. Hellinger	Prof. Dr. Remschmidt
Prof. Dr. Baum	PD Dr. Hesse	Prof. Dr. Rothmund
Prof. Dr. Baum	Prof. Dr. Hofmann	Prof. Dr. Renz
Prof. Dr. Becker	Prof. Dr. Jungclas	Prof. Dr. Schäfer
Prof. Dr. Christiansen	Prof. Dr. Kern	Prof. Dr. Schmidt
Prof. Dr. Czubayko	Prof. Dr. Klenk	Prof. Dr. Seitz
Prof. Dr. Dr. Daut	Prof. Dr. Koolman	Prof. Dr. Steiniger
Prof. Dr. Eilers	Prof. Dr. Krieg	Prof. Dr. Voigt
Prof. Dr. Fuchs	Prof. Dr. Kroll	Prof. Dr. Werner
Prof. Dr. Garten	Prof. Dr. Lang	HD Dr. Westermann
Prof. Dr. Geus	Prof. Dr. Moll	Prof. Dr. Wulf

## 12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Garten danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine stete Diskussionsbereitschaft und freundliche Unterstützung während der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk und Herrn Prof. Dr. S. Becker danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Dr. Markus Eickmann möchte ich herzlich danken für seine Fachkompetenz, die sehr gute theoretische und praktische Betreuung während dieser Arbeit und seine stete Bereitschaft, Probleme jeglicher Art anzupacken. Auch die Schwierigkeiten aufgrund der großen Distanz zwischen Essen und Marburg konnten überwunden werden.

Bei Simone Kiermayer, Ina Kraus, Amir Reza Vahhabzadeh und Hanno Scheffczik sowie allen ehemaligen Labormitarbeitern möchte ich mich für das nette und kooperative Arbeitsklima im Labor bedanken.

Mein Dank gilt all den Mitarbeitern des Instituts für Virologie in Marburg, die mir bei meiner Arbeit geholfen haben und die maßgeblich zu der sehr angenehmen Atmosphäre des Hauses beigetragen haben.

Bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Familie möchte ich mich für ihre große Unterstützung und ihr Vertrauen in mich ganz lieb bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Lebensgefährtin Sandra.